

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**ANGELINA RAFAELA DEBORTOLI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AGONISTA DO RECEPTOR DE  
ESTROGÊNIO ACOPLADO A PROTEÍNA G (G1) SOBRE O  
TÔNUS E REATIVIDADE VASCULAR CORONARIANA EM  
RATOS NORMOTENSOS DE AMBOS OS SEXOS.**

**VITÓRIA**  
**2015**

**Angelina Rafaela Debortoli**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AGONISTA DO RECEPTOR DE  
ESTROGÊNIO ACOPLADO A PROTEÍNA G (G1) SOBRE O  
TÔNUS E REATIVIDADE VASCULAR CORONARIANA EM  
RATOS NORMOTENSOS DE AMBOS OS SEXOS.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof°. Dr°. Roger Lyrio dos Santos

**Vitória  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Debortoli, Angelina Rafaela, 1985-

D287a      Avaliação do efeito do agonista do receptor de estrogênio  
acoplado a proteína G (G1) sobre o tônus e reatividade vascular  
coronariana em ratos normotensos de ambos os sexos/Angelina  
Rafaela Debortoli– 2015.

99 f. : il.

Orientador: Roger Lyrio dos Santos.

Coorientador: Margareth Ribeiro Moysés.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Artérias coronárias. 2. Vasodilatação. 3. Identidade de Gênero. I.  
Santos, Roger Lyrio dos. II. Moysés, Margareth Ribeiro. III.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da  
Saúde. IV. Título.

CDU: 612

---

# **ANGELINA RAFAELA DEBORTOLI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 24 de julho de 2015.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Roger Lyrio dos Santos - Orientador, UFES

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Margareth Ribeiro Moysés – co-orientadora, UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lusiane Maria Bendhack, USP

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nazaré Souza Bissoli, UFES

**VITÓRIA**  
**2015**

## **DEDICO ESTE TRABALHO**

*São muitas as pessoas que merecem a dedicatória deste trabalho. Em especial, dedico a minha Avó Etelvina (in memoriam) que sempre acreditou em mim como profissional. Dedico também ao meu amor, Emerson Guilherme, aos meus pais Sérgio e Euza e irmãos Gustavo e Eduardo.*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.*

*Aos meus pais Sérgio e Euza e aos meus irmãos Gustavo e Eduardo, simplesmente por serem parte de mim! Obrigada pelo carinho! Amo vocês!*

*Ao meu amor, companheiro, amigo, confidente Emerson Guilherme pelo carinho dedicado a mim durante esse tempo, por entender a minha ausência e por me incentivar sempre a continuar!*

*Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Roger Lyrio por me ensinar, por acreditar em meu trabalho e me transmitir parte de seu conhecimento.*

*À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Margareth, por me orientar, por me aceitar como aluna de mestrado juntamente com o professor Roger me permitindo realizar esse sonho.*

*Aos meus queridos amigos Wender e Nathalie, pela imensa ajuda sem a qual este trabalho não teria sido possível. Agradeço pela amizade e alegria que sempre prevaleceram em nossos dias de trabalho. Por me darem força naqueles dias em que tudo deu errado e por me ajudarem a seguir sempre adiante, por fazerem parte, sem dúvida alguma, dos melhores momentos desta jornada!*

*À amiga Jaísa Klauss e seu esposo Luis Henrique minha eterna gratidão a vocês que são grandes profissionais. Obrigada pelo cuidado e carinho que tiveram comigo. Admiro muito vocês!!!*

*Aos meus queridos amigos Erick, Simone e Fabrício, por me ajudarem, por estarem sempre presente, pela solicitude e paciência, pelas boas risadas, pelos bons momentos no café e pela bela amizade que criamos.*

*Ao amigo Vinícius pela amizade e pela excelente contribuição na realização do Western Blotting.*

*Aos alunos de iniciação científica Pamella, Juliana, Cassiano, Rafaela, Jéssica, Marjory, Rogério e Jeisdens por direta ou indiretamente me ajudarem na realização deste trabalho e por estarem sempre presentes! Meu muito obrigada!*

*A CAPES pela bolsa de estudo concedida.*

*Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFES, aos professores e a coordenadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivanita Stefanon!*

*“Para todas as coisas tenho  
força em virtude daquele que  
me confere poder”*

*Filipenses 4:13*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>16</b>
<b>LISTA DE ABREVIações .....</b>	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1 GERAL .....	30
2.2 ESPECÍFICOS .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	32
3.1.1 Grupos Experimentais.....	32
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	32
3.2.1 Estudos em Coração Isolado (Método Langendorff) .....	32
3.2.2 Avaliação não invasiva da Pressão Arterial .....	36
3.2.3 Dissecção das artérias coronárias .....	36
3.2.4 Western Blotting .....	37
3.2.5 Dihidroetídio (DHE).....	40
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41



<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) .....	42
4.2 PRESSÃO DE PERFUSÃO CORONARIANA (PPC).....	43
4.3 REATIVIDADE DO LEITO VASCULAR CORONARIANO .....	47
4.4 EXPRESSÃO DO RECEPTOR GPER.....	52
4.5 EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	53
4.6 MEDIDA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO – DIHIDROETÍDIO- DHE .....	54
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

## RESUMO

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte nos países industrializados. Além disso, a incidência de doenças cardiovasculares aumenta de forma significativa em mulheres na pós-menopausa, possivelmente por redução dos níveis de estrogênios. Os estrogênios exercem seus efeitos genômicos por meio da ativação de seus receptores nucleares  $\alpha$  e  $\beta$ , além de efeitos não genômicos via ativação de um terceiro receptor de estrogênio descoberto recentemente, denominado receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER), também conhecido como GPR30. As funções do GPER foram descritas principalmente no sistema cardiovascular. Estudos realizados em vasos isolados coronarianos demonstraram que a ativação do GPER promove vasodilatação de maneira dependente e independente do endotélio. No entanto, no leito coronariano, o papel deste receptor ainda não foi descrito. O objetivo do nosso estudo foi analisar a ação do G1, agonista específico do GPER, no leito vascular coronariano de ratos normotensos de ambos os sexos. Ratos Wistar com 10 semanas de idade foram divididos em 2 grupos: machos e fêmeas. Os animais foram anestesiados, o tórax foi aberto, o coração foi retirado e perfundido rapidamente com solução nutritiva a 37° C com fluxo constante de 10 mL/min, segundo a técnica de Langendorff. Após um período de 40 minutos de estabilização a pressão de perfusão coronariana foi determinada. Curva dose resposta de G1 (600 a 10.000 nM) foi realizada antes e após a realização dos seguintes protocolos: Inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) com L NAME, inibição da enzima ciclooxigenase (COX), inibição da enzima citocromo P450 (CYP), inibição associada da NOS e COX, inibição associada da NOS e CYP, inibição tripla da NOS, COX e CYP, bloqueio dos canais para potássio com tetraetilamônio (TEA) e bloqueio com antagonista específico do GPER (G36). Além desses protocolos, a pressão arterial sistólica (PAS) desses animais foi mensurada por pletismografia de cauda. Fizemos também a dissecação das coronárias descendente anterior e septal para realização de Western Blotting para avaliar a expressão do GPER, enzimas antioxidantes (SOD e catalase) e subunidade da NADPH oxidase. O estresse oxidativo em artérias coronárias foi avaliado por fluorescência ao DHE.

Nossos resultados mostram a existência de uma diferença na PAS e PPC entre machos e fêmeas. A PAS mostrou-se elevada em machos, sendo que a PPC foi maior nas fêmeas. O G1 promoveu vasodilatação no leito coronariano de ratos de ambos os sexos sendo essa resposta mais pronunciada em fêmeas. A expressão do GPER, SOD e catalase foi similar entre os grupos. A expressão da gp91phox e o estresse oxidativo foram maiores em machos. A dilatação ao G1 em fêmeas foi reduzida após inibição individual da NOS, COX e CYP, após inibição combinada da NOS + CYP e após inibição tripla da NOS + COX + CYP. Ao utilizar G36 na preparação experimental, a vasodilatação neste grupo foi revertida em vasoconstrição. Após o uso do TEA a dilatação em fêmeas e machos foram maiores. O relaxamento foi reduzido nos machos após inibição individual da COX e CYP e após inibição combinada da NOS + COX. O uso do G36 aboliu o relaxamento neste grupo.

Com base nos resultados obtidos, concluímos que o G1 dilata o leito vascular coronariano de ratos wistar de ambos os sexos e essa resposta é menos pronunciada em machos, provavelmente porque neste grupo a produção de espécies reativas de oxigênio é maior. Além disso, o NO não participa da resposta de relaxamento induzida pelo G1 em machos. Os três autacóides endoteliais (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF) parecem mediar o relaxamento induzido pelo agonista do GPER em fêmeas. Esses achados podem contribuir para o melhor entendimento das ações do G1 sobre o sistema cardiovascular, de forma a tornar esse fármaco uma potencial terapia a ser utilizada na pós-menopausa baseada nos efeitos observados no leito coronariano.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases represent the main cause of death in developed countries. Moreover, the incidence of cardiovascular diseases increases significantly in postmenopausal women, possibly because of a reduction of estrogen levels. Estrogens exert their genomic effects by activating their nuclear receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , besides no genomic effects via activation of a third estrogen receptor, recently released, named estrogen receptor coupled to protein G (GPER), also known as GPR30. The GPER function were described mainly in the cardiovascular system. Some studies in isolated coronary vessels, demonstrate that the GPER activation, promotes dependently or independently, the vasodilatation in the endothelium. However, in the coronary bed, this receptor role was not described. The aim of our work was to analyze the action of G1, the specific agonist of GPER in both sexes of normotensive rats' coronary vascular bed. 10-month-old Wistar Rats, were divided into two groups: males and females. The animals were anesthetized, their chests were opened, their hearts were removed, and rapidly perfused with nourishing solution at 37° C with constant flow of 10 mL/min, according to Langendorff's technique. After a period of 40 min of stabilization, the pressure of coronary perfusion was determined. Dose response curve G1 (600 a 10.000 nM) was performed before and after the follow protocols: inhibition of the nitric oxide synthase enzyme (NOS) with L NAME, inhibition of cyclooxygenase enzyme (COX), inhibition of cytochrome enzyme P450 (CYP), associated inhibition of NOS and COX, associates inhibition of NOS and CYP, triple inhibition of NOS, COX and CYP, blockade of potassium channels with tetraethylammonium (TEA) and blockade with GPER specific antagonist (G36). Besides these protocols, the animals' systolic blood pressure was measured through tail plethysmography. We also dissected their anterior and septal descending coronaries to perform Western Blotting in order to evaluate the GPER expression, antioxidant enzymes (SOD e catalase) and subunit of NADPH oxidase. Oxidative stress in coronary arteries was evaluated through fluorescence to the DHE. Our results show the existence of a difference in PAS and PPC between males and females. PAS was higher in males while PPC was higher in females. G1 promoted vasodilatation in rats'

coronary bed in both sexes, being this response more pronounced in females. GPER, SOD and catalase expression was similar in both groups. Whereas gp91phox expression and oxidative stress were larger in males. The dilatation to G1 in females was reduced after individual inhibition of NOS, COX and CYP, after combined inhibition of NOS + CYP and after triple inhibition of NOS + COX + CYP. Using G36 in experimental preparation, the vasodilatation in this group was reverted into vasoconstriction. After using TEA, dilatation in males and females was larger. Relaxation was reduced in males after individual inhibition of COX and CYP and after combined inhibition of NOS + COX. The use of G36 abolished relaxation in this group. Based on the results, we concluded that G1 expanded the Wistar rats coronary vascular bed in both sexes and this response is less pronounced in males, probably because in this group the production of reactive species of oxygen is larger. Furthermore, NO does not participate in the response of relaxation induced by G1 in males. The three endothelial autacoids (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF) seem to mediate the relaxation induced by GPER agonist in females. These findings can contribute to a better understanding of G1 action on cardiovascular system, in order to make it a potential drug therapy to be used in postmenopausal period, based on the presented effects on coronary bed.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do G1, G15 e G36.....	25
<b>Figura 2:</b> Efeitos sistêmicos da ativação do GPER .....	27
<b>Figura 3:</b> Determinação da pressão arterial sistólica em ratos Wistar fêmeas e machos .....	41
<b>Figura 4:</b> Determinação da pressão de perfusão coronariana em corações de ratos Wistar fêmeas e machos .....	42
<b>Figura 5:</b> Pressão de perfusão coronariana em corações de ratos fêmeas (A) e machos (B) antes e após inibição do GPER com G36 .....	45
<b>Figura 6:</b> Resposta vasodilatadora a concentrações de G1 em ratos machos e fêmeas antes (6A) e após inibição com G36 (6B) .....	46
<b>Figura 7:</b> Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de G1 antes e após inibição com: LNAME, indometacina e clotrimazol em fêmeas e machos ...	48
<b>Figura 8:</b> Resposta vasodilatadora a concentrações crescentes de G1 antes e após inibição com: L- NAME+ indometacina, L NAME + clotrimazol; L NAME+ indometacina + clotrimazol e bloqueio dos canais para potássio com tetrabutylamônio.....	50
<b>Figura 9:</b> Análise da expressão protéica do GPER em fêmeas e machos Wistar.....	51
<b>Figura 10:</b> Análise da expressão protéica das enzimas SOD-2, catalase e gp91phox de ratos de ambos os sexos.....	52

<b>Figura 11:</b> Imagens emitidas por dihidroetídeo (DHE) em artérias coronárias de fêmeas e machos antes e após fluorescência e gráfico com análise da fluorescência .....	53
--	----

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Pressão de perfusão coronariana (PPC, mmHg) de ratos após inibições com: L-NAME, indometacina, L-NAME + indometacina ou L-NAME + clotrimazol... ..... 43

**Tabela 2:** Pressão de perfusão coronariana (PPC, mmHg) de ratos após inibições com: L-NAME + indometacina, L-NAME + clotrimazol e L-NAME + indometacina + clotrimazol ou tetrabutylamônio. .... 44



## LISTA DE ABREVIações

**AI** Angiotensina I

**AI** Angiotensina II

**Akt** - Proteína cinase B

**AMPc 3',5'** Monofosfato de adenosina cíclico

**AT-1** Receptor de angiotensina do tipo1

**ATP** Adenosina Trifosfato

**Cálcio** Ca<sup>2+</sup>

**CAT** Catalase

**cGMP 3',5'**-Guanosina monofosfato cíclico

**CMLV** Celulas do Músculo liso vascular

**COX** Ciclooxygenase

**C-Src** Serina treonina quinase

**CYP** Citocromo P450

**DCV** Doenças cardiovasculares

**DHE** Dihidroetídio

**E2** 17-β estradiol

**ECA** enzima conversora de angiotensina

**EDH** Hiperpolarização dependente do endotélio

**EDHF** Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

**EDRF** Fator relaxamento derivado do endotélio

**EDRF** Fator de relaxamento derivado do endotélio

**EETs** Ácido epoxieicosatrienóicos

**EGFR** Receptor do fator de crescimento epidermal ligado a heparina

**eNOS** Óxido nítrico sintase endotelial

**ERA** *Estrogen Replacement and Atherosclerosis*

**EROS-** Espécies reativas de oxigênio

**GPGR** Receptor de estrogênio acoplado a proteína G

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de Hidrogênio

**HDL** Lipoproteína de alta densidade

**HERS** *Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*

**K<sup>+</sup>** Potássio

**K<sub>ca</sub>** Canal de potássio ativado por cálcio

**LDL** Lipoproteína de baixa densidade

**LDL-ox** Lipoproteína de baixa densidade oxidada

**L-NAME** Nω-nitro-L-Arginina Metil Éster – Inibidor não seletivo da eNOS

**MMP** Metaloproteinases de matriz

**NADPH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NO** Óxido nítrico

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** Ânion superóxido

**PAS** Pressão arterial sistólica

**PGI<sub>2</sub>** Prostaciclina

**PI3K** Fosfatidilinositol-3-cinase

**PPC** Pressão de perfusão  
coronariana

**RE $\alpha$**  Receptor de estrogênio do tipo  
 $\alpha$

**RE $\beta$**  Receptor de estrogênio do tipo  
 $\beta$

**SERMs** Moduladores seletivos de  
receptor de estrogênio

**SHR** *Spontaneously Hypertensive  
Rat*

**SOD** Superóxido Dismutase

**SRAA** Sistema renina-angiotensina-  
aldosterona

**TEA** Tetraetilamônio

**VLDL** Lipoproteína de muito baixa  
densidade

**WHI** *Women's Health Initiative*

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morte no mundo (Mensah e Browm, 2007), ultrapassando os óbitos devido a todas as neoplasias e AIDS (Must et al., 1999; Simsekyilmaz et al., 2015). Este fato se confirma quando observamos que no Brasil as DCV são responsáveis por cerca de 20 % de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos (Mansur e Favarato, 2012).

Esta bem estabelecido que os homens são mais propensos ao risco de desenvolverem DCV do que as mulheres na pré-menopausa com a mesma idade. Não obstante às diferenças de gênero, as DCV também são a principal causa de morte entre mulheres, sobretudo na segunda metade da vida (*American Heart Association*, 2004; Heron, 2013). Mulheres na pós-menopausa são mais susceptíveis a eventos cardiovasculares, possivelmente por alterações dos níveis hormonais (Kurt e Buyukafsar, 2013), mais especificamente devido a diminuição dos níveis de estrogênio no plasma (Mendelsohn et al., 2007). O que se tem constatado é que não é o fator idade que determina o aumento da incidência de DCV nesta população, mas sim a menopausa.

A menopausa, palavra que advém do grego como junção das palavras *mês* ou *regras* mais *parada* (Mucida, 2006) é um processo biológico natural na vida de uma mulher, definido como a cessação da menstruação, resultante da interrupção da atividade folicular ovariana (Paoletti et al., 2003). Este evento ocorre dentro do período do climatério (Polisseni, 2009). No entanto, a menopausa também pode ser induzida, por meio da ooforectomia bilateral, associada ou não à histerectomia. (Valença et al., 2010).

O climatério, designação proveniente da palavra grega *Kli-makter-eros*, que significa ponto crítico da vida humana, é o período do envelhecimento feminino marcado pela transição de uma fase reprodutiva para um estado não reprodutivo caracterizado pelo estabelecimento de um estado fisiológico de

hipoestrogenismo progressivo (Silva, 2006). Este período inicia-se normalmente entre 35 e 40 anos, estendendo-se até os 65 anos, ao qual está associado um conjunto de sinais e sintomas a curto e médio prazo como fogachos, alterações do humor, ressecamento da pele e mucosa vaginal, alterações no ciclo menstrual e distúrbio do sono que apresentam grande impacto na mulher (Mucida, 2006; Silva, 2006). Além das queixas a curto e médio prazo, a deficiência de estrogênio causa sintomas vasomotores, declínio cognitivo e um aumento no risco de doenças crônico-degenerativas, como as DCV, osteoporose e doença de Alzheimer (Spritzer e Wender, 2007).

Os estrogênios, mais especificamente o 17  $\beta$ -estradiol, comumente reconhecido como o hormônio sexual feminino predominante, desempenha um papel importante no desenvolvimento dos órgãos reprodutores e características sexuais secundárias em fêmeas, além de participar do desenvolvimento e função reprodutora de machos (Hess, 2003). Participam também de eventos fisiológicos importantes como a puberdade e a gravidez. (Platet et al., 2004) e regulam uma variedade de processos fisiológicos em quase todas as outras áreas do corpo como funções imunológicas, sistema nervoso, cardiovascular, muscular, esquelético e sistema endócrino (Edwards, 2005; Prossnitz et al., 2011).

Os estrogênios são considerados protetores endógenos do sistema cardiovascular em mulheres (Kurt e Buyukafsar 2013) e essa cardioproteção se dá por meio de modificações do perfil lipídico (Ruiz-Sanz et al., 2001, White, 2002), onde este atua elevando os níveis plasmáticos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e reduzindo os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Keaney et al., 1994) o que se confirma em estudos onde a administração de estrogênio exógeno foi associada a elevações do HDL e reduções de LDL e colesterol (Gruchow et al., 1988; Vaziri et al., 1993). Ademais, o estrogênio aumenta a expressão dos receptores de LDL e diminui a produção e o tamanho das partículas de LDL além de aumentar a depuração de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). O estradiol, que é um fenol com propriedades antioxidantes capaz de sequestrar radicais livres e estimular

a síntese de importantes enzimas antioxidantes, previne a oxidação do LDL e VLDL, protegendo a vasculatura contra os efeitos deletérios dos lipídios oxidados (Dubey e Jackson 2001). Ele impede o comprometimento da barreira endotelial mediada pelo LDL e atenua o acúmulo de LDL e LDL oxidado na parede da artéria (Gardner et al., 1999).

Além da capacidade de modular o perfil lipídico, o estrogênio também é capaz de reduzir o efeito de moléculas vasoconstritoras tais como angiotensina II (AII) e endotelina. A diminuição desse efeito ocorre devido a capacidade do estrogênio de diminuir a expressão dos receptores do tipo I de angiotensina II (AT1) (Gragasin et al., 2003), além de inibir a atividade da renina, enzima responsável pela conversão de angiotensinogênio em angiotensina I (AI) (Fisher et al., 2002), porém, o mecanismo envolvido ainda não está inteiramente esclarecido. Estudos mostram que a redução da renina ocorreria devido à diminuição da atividade simpática, que é conhecida ser mais baixa em mulheres que fazem uso de terapia de reposição hormonal (Pasqualini et al, 1991).

Em relação à endotelina, o estrogênio inibe sua vasoconstrição em vários leitos vasculares (Lamping e Nuno, 1996; Sudhir et al., 1997; Teoh et al., 2000; Tsang et al., 2004) possivelmente via inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou estimulação do bombeamento de cálcio nas células do músculo liso vascular (CMLV) (Jiang et al., 1992; Prakash et al., 1999). Samaan et al. (1995) afirmam que o estrogênio pode reduzir o fibrinogênio circulante, consequentemente diminuindo os eventos tromboembólicos.

O estrogênio também tem mostrado efeito benéfico sobre a função endotelial por estimular a liberação dos fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF) sendo eles: óxido nítrico (NO), prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). A liberação de NO dependente do endotélio estimulada pelo estrogênio é resultado da ativação rápida da PI3k/AKT e subsequente fosforilação da NO sintase tipo III (eNOS) (Haynes et al., 2000; Simoncini et al., 2000). Além disso, o estrogênio aumenta: i) a

disponibilidade de L-arginina; ii) ativa vias não-genômicas de segundos mensageiros (Simoncini, 2009); e iii) modula os níveis de antagonistas endógenos (Monsalve et al., 2007).

Estrogênio está envolvido na regulação da produção de prostanóides em células endoteliais tais como PGI<sub>2</sub>. Estudos demonstraram que concentrações fisiológicas de estradiol causaram uma estimulação rápida da síntese de PGI<sub>2</sub> (dentro de 15 min) em culturas de células endoteliais da artéria pulmonar de ovinos (Sherman et al., 2002) e em cultura de células endoteliais de veia umbilical de humanos (Alvarez et al., 2002). A PGI<sub>2</sub> é um inibidor potente da adesão e agregação plaquetária na superfície da célula endotelial e geralmente atua como vasodilatador derivado do endotélio e inibidor da migração e proliferação de células do músculo liso vascular (Moncada e Vane 1978; Fetalvero et. al., 2007).

O relaxamento dependente do endotélio em resposta ao estrogênio envolve também o EDHF, incluindo os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o íon potássio e junções comunicantes endotelial, que são alguns dos candidatos a EDHF (Huang et al., 2004; Luksha et al., 2006; Traupe et al., 2007). Este fato se confirma em estudos mostrando que o estrogênio parece modular a vasodilatação mediada pelo EDHF em artéria cerebral média de ratos, durante a estimulação pelo ATP (Golding e Kepler, 2001).

Estudos prévios, realizados em nosso laboratório, demonstraram que o tratamento com 17 β-estradiol potencializa a vasodilatação induzida pela serotonina em artérias coronárias de ratos (Moysés et al., 2001). Santos et al. (2004) acrescentaram que em artérias coronárias o 17 β-estradiol estimula a liberação de NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF, sendo que os dois últimos parecem desempenhar um papel mais importante como mediadores da resposta relaxante ao 17 β-estradiol. Além disso, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), esse hormônio foi capaz de relaxar artérias coronárias de fêmeas e machos via mecanismos mediados pelo endotélio, assim como por

uma ação direta sobre o músculo liso vascular, sendo que em fêmeas o NO, EDHF e canais de potássio parecem ter o papel mais importante como mediadores da resposta de relaxamento, enquanto que nos machos o NO e os canais de potássio parecem ser mais importantes (Santos et al., 2010).

A relevância destes estudos em artérias coronárias se deve ao papel fundamental desses vasos para a vitalidade do coração. Embora represente apenas 5% do débito cardíaco, a circulação é essencial para o coração, pois fornece oxigênio, além de transportar substratos e remover metabólitos para assegurar condições de trabalho ideais para a célula miocárdica (Berne e Rubio, 1975).

Além da importante ação protetora do estrogênio sobre o endotélio vascular, este hormônio também é capaz de agir diretamente sobre o músculo liso vascular, reduzindo a contração das células por meio da inibição da regulação intracelular dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , proteína quinase C e sinalização da Rho-Kinase (Reslan e Khalil, 2012) além de inibir a proliferação celular (Pare et al., 2002) e atenuar a inflamação vascular (Rodriguez et al., 2002).

No entanto, o estrogênio tem se revelado uma molécula contraditória, sendo ao mesmo tempo nocivo e importante para a saúde da mulher. Platet et al., 2004, afirmam que o estrogênio desempenha um papel importante na regulação do crescimento e diferenciação normal de tipos de células epiteliais mamárias pré-malignas e malignas por meio da ligação ao seus receptores de estrogênio nucleares  $\alpha$  e  $\beta$ , além de exercer ação proliferativa sobre o endométrio podendo levar a hiperplasia, e em casos mais graves, progredir para o adenocarcinoma endometrial (Hale et al., 2002). Ademais, o estrogênio pode contrair artérias coronárias pelo aumento do estresse oxidativo sob certas condições, demonstrando ações bivalentes desse hormônio. (White et al., 2005). Estudos clínicos indicam que a terapia de reposição com estrogênio pode aumentar o risco de doença coronariana em mulheres na pós-menopausa (Rossouw et al., 2002). Nesses estudos realizados no final da década de 90 e início do ano 2000 (*Heart and Estrogen/ Progestin Replacement Study [HERS]*

& *Women's Health initiative [WHI]*) observou-se que a terapia de reposição hormonal (estrogênio–progestagênio) foi responsável por efeitos adversos, aumentando os riscos de eventos cardiovasculares em mulheres com e sem doença coronariana estabelecida (Hulley et al., 1998; Roussouw et al., 2002) No entanto, tais trabalhos trazem diversas contestações metodológicas que parecem ser relevantes aos resultados, como o fato de incluírem, na maioria, mulheres na pós-menopausa já com longo período sem os efeitos cardioprotetores do estrogênio. Dúvidas suscitadas pelo estudo *HERS* foram avaliadas por outras pesquisas como no *Estrogen Replacement and Atherosclerosis (ERA)*, cujo objetivo foi analisar a progressão da arteriosclerose, medida por angiografia coronariana, em mulheres na pós-menopausa, tratadas com estrogênio conjugados e placebo. Entretanto, este estudo não destacou diferenças de resultados entre os grupos (Herrington et al., 2000).

Após esses estudos e devido às complicações da terapia de reposição hormonal, alguns pesquisadores passaram a investigar outros compostos em esquemas de reposição que pudessem oferecer os benefícios semelhantes ao estrogênio, dentre eles: fitoesteróides como a isoflavona (Nahás et al., 2003), tibolona (Pantaleão et al., 2009), moduladores seletivos de receptor de estrogênio, tais como o tamoxifeno (Borgo et al., 2011), raloxifeno, clomifeno (Ferreira et al., 2011) e dentre esses compostos farmacológicos, a mais recente alternativa utilizada nas pesquisas experimentais sobre reposição hormonal, o G1, um agonista seletivo do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER), tem sido colocado em destaque (Bologa et al., 2006; Nilsson et al., 2011).

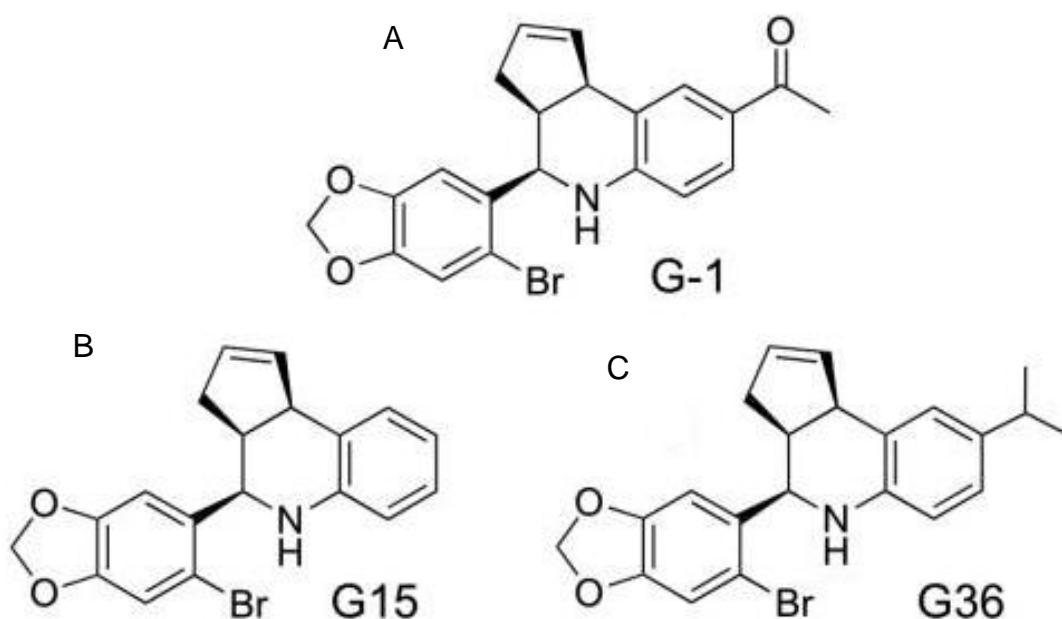
Os estrogênios exercem tipicamente seus efeitos genômicos via receptor de estrogênio  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) e receptor de estrogênio  $\beta$  (RE $\beta$ ), além de efeitos não-genômicos por meio da ligação com o receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) (Filardo et al., 2000; Revankar et al., 2005). O RE $\alpha$  foi identificado no útero de ratas em 1960 (então denominado RE) (Talwar et al., 1964; Soloff e Szego, 1969). O segundo receptor, bem menos caracterizado,



RE $\beta$ , foi identificado na próstata de ratos, em 1996 e difere do RE $\alpha$  em relação a sua localização tecidual (não presente na pituitária de adultos e endométrio) e domínio de ativação da transcrição (Kuiper et al., 1996; Dechering et al., 2000). O terceiro receptor de estrogênio, o GPER, foi identificado no final de 1990 como um receptor órfão, sem nenhum ligante conhecido, e assim nomeado primariamente como GPR30 (Carmeci et al., 1997; Takada et al., 1997). Este receptor, pertence à família dos receptores acoplados à proteína G, está localizado no cromossomo 7 locus 22, é composto por três éxons, apresenta um peso molecular de aproximadamente 41 KDa e possui 375 aminoácidos (Mizukami, 2010). O receptor cDNA foi identificado a partir de várias fontes, incluindo os linfócitos B (Owman et al., 1996, Kvingedal e Smeland, 1997), células endoteliais humanas expostas à tensão de cisalhamento (Takada et al., 1997) e células de câncer de mama (Carmeci et al., 1997). Em 2000, estudos pioneiros demonstraram que a expressão do GPER foi necessária para ativação rápida da ERK1/2 mediada pelo estrogênio (Filardo et al., 2000) e, subsequentemente, em 2002, para geração de AMPc (Filardo et al., 2002). Em 2005, a ligação do estrogênio ao GPER foi demonstrada por vários grupos (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005). Em seguida, a união internacional de farmacologia básica e clínica em 2008, passou a designar o GPR30 de GPER, por comprovar sua boa afinidade como receptor de estrogênio; sua ampla distribuição no sistema cardiovascular humano e animal de ambos os sexos (Alexander et al., 2008).

A investigação das atividades exclusivas do GPER foi auxiliada pela descoberta de agentes específicos. Em 2006, o G1 (Figura 1A), o primeiro agonista seletivo do GPER, foi descrito (Bologa et al., 2006). A comprovação de que este agonista é um ligante específico para o GPER veio a partir de estudos usando o G1 em concentrações altas (1-10  $\mu$ mol/L) onde não houve nenhuma atividade notável deste agente em relação ao RE $\alpha$  em termos de ativação ou inibição de eventos de sinalização rápida (Revankar et al., 2005) ou *downregulation* do RE $\alpha$  (Albanito et al., 2007). Além disso, o G1 não foi capaz de se ligar a nenhum outro receptor importante acoplado a proteína G (Blasko et al., 2009), ou em camundongos Knockout para o GPER (Wang et

al.,2009). Em 2009, um antagonista seletivo GPER, o G15 (Figura 1B), foi identificado (Dennis et al., 2009), seguido pelo G36 (Figura 1C), um antagonista GPER mais seletivo do que G15, identificado em 2011 (Dennis et al., 2011).



**Figura 1:** Estrutura química do G1 (A), G15 (B) e G36 (C). Modificado de Dennis et al., 2011.

Estas descobertas levaram a um aumento do número de estudos relacionados à ativação do GPER, abordando as funções celulares e fisiológicas deste receptor relacionados à doença ou promoção da saúde (Prossnitz e Barton, 2011).

Além dos ligantes acima citados, a literatura tem demonstrado um grande número de outras substâncias capazes de interagir com o GPER. Alguns autores demonstraram que outros esteróides, além do estrogênio, tais como testosterona, cortisol e a progesterona também são capazes de ativar o GPER, porém com menor afinidade (Thomas et al., 2005). Há controvérsias em relação ao envolvimento da aldosterona com o GPER. Embora Gros et al., (2011), tenha sugerido que a expressão deste receptor esteja envolvida em

certas ações rápidas da aldosterona, um estudo recente foi incapaz de detectar esta ação (Cheng et al., 2013). Dos anti-estrogênios terapêuticos, o ICI 182,780, um Selective Estrogen Receptor Downregulator foi capaz de agir como agonista do GPER, mesmo atuando como antagonista dos receptores de estrogênio clássicos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) (Filardo et al., 2000). Da mesma forma, 4-hidroxitamoxifeno (o metabolito ativo de tamoxifeno, um modulador do receptor de estrogênio seletivo, SERM) também atua como um agonista GPER (Revankar et al., 2005; Vivacqua et al., 2006), e, recentemente, o raloxifeno tem sido também demonstrado ativar GPER em células deficientes para RE $\alpha$  (Petrie et al., 2013). Um grande número de fitoestrogênios também exibem atividade agonista em relação GPER, incluindo genisteína (Maggiolini et al., 2004; Thomas e Dong, 2006; Vivacqua et al., 2006), a quercetina (Maggiolini et al., 2004), o equol (Rowlands et al., 2011) e o resveratrol (Dong et al., 2013). Finalmente, muitos compostos sintéticos a partir das indústrias de pesticidas e plásticos conhecidos por terem efeitos estrogênicos também foram capazes de se ligar e / ou ativar GPER, incluindo atrazina (Albanito et al., 2008); bisfenol A (Dong et al., 2011, Chevalier et al., 2012; Pupo et al., 2012; Sheng et al., 2013), daidzeína (Kajta et al., 2013), zearalonone, nonfenol e Kepone, (Thomas e Dong, 2006).

Há divergências na literatura com relação à localização celular desse receptor. Por ser um receptor acoplado a proteína G, ele deveria estar localizado na membrana plasmática como foi demonstrado por Funakoshi et al. (2006). Porém alguns autores relatam que GPER localiza-se, na membrana do retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (Revankar et al., 2005; Sakamoto et al., 2007). A hipótese mais aceita para explicar esse fato é que, assim como outros receptores acoplados a proteína G, o GPER passaria por um processo de endocitose após a sua estimulação (Cheng et al., 2011).

Até presente data, as funções do GPER foram descritas em quase todos os sistemas fisiológicos, incluindo reprodutivo, endócrino, urinário, nervoso, imunológico, músculo esquelético e cardiovascular, mostrados na figura 2 (Prossnitz e Barton, 2011).



**Figura 2:** Experimentos atuais e evidências clínicas demonstram o papel fisiológico do GPER em funções cerebrais e neuroendócrinas, função de células imune e imunidade, regulação endócrina e metabólica, função vascular músculo esquelética, miocárdica e renal bem como desenvolvimento e funções reprodutivas. Modificado de Prossnitz e Barton, 2014.

Os efeitos do agonista G1 como um vasodilatador foram determinados nas artérias mesentéricas (Lindsey et al., 2011), aorta, (Lindsey et al., 2009), artéria carótida de ratos (Broughton et al., 2010) assim como em artérias mamárias internas humanas (Haas et al., 2007) e artérias coronárias suínas (Meyer et al., 2010). Em contrapartida, Kurt e Buyukafsar, (2013) demonstraram que G1, em doses crescentes, evoca uma vasoconstrição significativa no rim isolado e perfundido de ratos, suscitando ações bivalentes deste fármaco.

A vista do exposto, ainda existe uma lacuna no que diz respeito aos reais e potenciais efeitos do G1 sobre o sistema cardiovascular. Atualmente, também não são encontrados estudos que avaliaram a ação do G1 no leito vascular coronariano. De fato, os trabalhos revelam uma necessidade de maiores avaliações experimentais para que se consiga entender e validar seus mecanismos em ambos os gêneros. Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar a ação do G1 no leito vascular coronariano de ratos de ambos os sexos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Analisar a resposta do agonista do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (G1) no leito vascular coronariano de ratos Wistar de ambos os sexos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Verificar possíveis diferenças na pressão arterial sistólica e pressão de perfusão coronariana basal;
- Verificar a participação do GPER na ação induzida pelo G1, mediante a utilização do seu antagonista específico, G36, bem como uma possível participação na modulação da pressão de perfusão coronariana;
- Avaliar a contribuição dos mediadores endoteliais na ação induzida pelo G1 de ratos de ambos os sexos mediante a:
  - Inibição da síntese do óxido nítrico (NO);
  - Inibição da síntese de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>);
  - Inibição da síntese do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF);
  - Inibição combinada da síntese de NO e PGI<sub>2</sub>;
  - Inibição combinada da síntese de NO e EDHF;
  - Inibição combinada da síntese de NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF;
- Verificar a participação dos canais para potássio na ação induzida pelo G1, utilizando tetraetilamônio (TEA), um inibidor inespecífico desses canais;

- Verificar possíveis diferenças na expressão do GPER em ratos normotensos de ambos os sexos;
- Quantificar a expressão das proteínas superóxido dismutase (SOD 2), catalase e subunidade da NADPH oxidase (gp91phox) em ratos de ambos os sexos;
- Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio pela oxidação do dihidroetídio (DHE) nas artérias coronárias dos grupos experimentais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados ratos adultos de ambos os sexos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 10 semanas de idade, fornecidos pelo biotério central do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. O protocolo da pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES sob parecer número 048/2013. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com livre acesso a água e ração (Purina Labina), em sala com temperatura (22-24 °C) e umidade (40-60 %) controladas e ciclo de luz claro/escuro alternados a cada 12/12 horas.

##### **3.1.1 Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos em machos e fêmeas.

#### **3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

##### **3.2.1 Estudos em Coração Isolado (Método Langendorff)**

Neste experimento, investigamos a reatividade do leito coronariano em resposta ao G1. Os animais foram eutanasiados sob anestesia com tiopental sódico (50 mg/kg/ via intraperitoneal), o tórax foi aberto, os órgãos torácicos foram expostos os corações foram dissecados de suas conexões e imediatamente transferidos para o aparelho de perfusão isolada através da canulação da aorta, no nível de sua curvatura, começando a seguir a perfusão retrógrada, pelo método de Langerdorff modificado.



Foi utilizada para a perfusão, uma solução nutriente composta de NaCl, 120 mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,25 mM; KCl, 5,4 mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2,0 mM;  $\text{NaHCO}_3$ , 27,0 mM;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1,2 mM; EDTA, 0,03 mM e glicose 11,0 mM, mantida a 37°C por um banho-maria, e continuamente pressurizada por mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ) na câmara de saturação. O fluxo coronariano foi mantido constante em 10 mL/min por meio de uma bomba de rolete (Hugo Sachs, Germany). A pressão de perfusão coronariana (PPC) basal foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (Statham Transducer P23Db), conectado imediatamente próximo da cânula de perfusão aórtica, através do qual foi perfundido o leito coronariano e ligado ao sistema digital de aquisição de dados (PowerLab Sistem). Como o fluxo foi mantido constante em 10mL/min, por meio de uma bomba rolete, as alterações da PPC foram diretamente relacionadas às mudanças de resistência vascular.

Após 40 minutos de estabilização da preparação de coração isolado, a PPC basal foi determinada e foi iniciado o estudo da reatividade coronariana por meio de uma curva dose-resposta (600 a 10.000 nM), obtida com aplicações de doses crescentes de G1 antes e após inibição individual ou combinada dos fatores vasodilatadores derivados do endotélio (NO,  $\text{PGI}_2$  e EDHF), conforme protocolo experimental, e perfusão com os seguintes inibidores: N $\omega$  – nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME, 100  $\mu\text{M}$ ), indometacina (2,8  $\mu\text{M}$ ), clotrimazol (0,75  $\mu\text{M}$ ), bloqueio dos canais para potássio (TEA) e inibição do GPER com G36. Estes protocolos tiveram como objetivo a avaliação da participação dos fatores endoteliais e dos canais para potássio na reatividade vascular coronariana induzida pelo G1, bem como confirmar o envolvimento do GPER mediando as ações do G1, além de uma possível modulação do tônus coronariano. O G1 foi diluído em DMSO a 100% e a concentração final de DMSO foi de 5 a 10% por dose de G1.

### 3.2.1.1 Protocolo Experimental:

#### **Protocolo 1**

Com objetivo de avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora ao G1 nos vasos coronarianos, curva dose resposta de G1 (600 – 10.000 nM) foi realizada antes e após o uso de um inibidor inespecífico da NOS, N<sub>ω</sub>-nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME, 100 µM) que foi adicionado à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos.

#### **Protocolo 2**

Com o objetivo de avaliar a participação da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) na resposta vasodilatadora ao G1, curva dose resposta de G1 (600 – 10.000 nM), foi realizada antes e após o uso de um inibidor da enzima ciclooxygenase (COX), indometacina (2,8 µM), que foi adicionado à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos.

#### **Protocolo 3**

Com o objetivo de avaliar a participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na resposta vasodilatadora ao G1, curva dose resposta de G1 (600 – 10.000 nM) foi realizada antes e após o uso do inibidor da citocromo P450 (CYP), clotrimazol (0,75 µM) que foi adicionado à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos.

#### **Protocolo 4**

Com o objetivo de avaliar a resposta induzida pelo G1 independente de NO/PGI<sub>2</sub>, curva dose resposta de G1 (600 – 10.000 nM) foi realizada antes e

após inibição combinada da NOS e COX, com L-NAME (100  $\mu$ M) e indometacina (2,8  $\mu$ M), respectivamente. Ambos os inibidores foram simultaneamente adicionados à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos.

### **Protocolo 5**

Com o objetivo de avaliar a resposta induzida pelo G1 independente de NO/EDHF, curva dose resposta de G1 (600 – 10.000 nM) foi realizada antes e após inibição combinada da NOS, da CYP com L-NAME (100  $\mu$ M) e clotrimazol (0.75  $\mu$ M) respectivamente. Ambos os inibidores foram simultaneamente adicionados à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos.

### **Protocolo 6**

Com o objetivo de avaliar a resposta induzida pelo G1 independente de NO/PGI<sub>2</sub> EDHF, curva dose resposta de G1 (600 – 10.000 nM) foi realizada antes e após inibição combinada da NOS, da enzima ciclooxigenase (COX), e da CYP utilizando L-NAME (100  $\mu$ M) indometacina (2,8  $\mu$ M), e clotrimazol (0.75  $\mu$ M) respectivamente. Os inibidores foram simultaneamente adicionados à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos.

### **Protocolo 7**

Com o objetivo de confirmar a participação do GPER na resposta dilatadora encontrada, curva dose resposta de G1 (600 – 10.000 nM) foi realizada antes e após administração do antagonista GPER, G36 (1  $\mu$ M). O antagonista foi adicionado à solução de perfusão por 20 minutos.

## **Protocolo 8**

Com o objetivo de avaliar a participação dos canais para potássio na resposta induzida pelo G1, curva dose resposta de G1 (600 – 10.000 nM) foi realizada antes e após o bloqueio inespecífico desses canais com tetraetilamônio (TEA) (4 mM). O bloqueador foi adicionado à solução de perfusão durante pelo menos 20 minutos.

### **3.2.2 Avaliação não invasiva da Pressão Arterial**

Antes da realização dos registros foi necessário aclimatar os animais no equipamento utilizado (*IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, Ca 91367-1253 USA*). O processo de aclimação foi de 3 dias antes à coleta do registro. A aclimação consiste no acondicionamento do animal por cerca de 10 minutos no equipamento, evitando a influência do estresse sobre a pressão arterial. No dia do registro os animais foram acomodados na câmara aquecida dentro de um contentor com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na região próxima a cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor de pressão arterial sistólica foi obtido por meio de sinais do transdutor acoplado a um computador. A temperatura foi controlada entre 29 e 32 °C durante o tempo necessário em que o animal permaneceu no equipamento. Foi obtida a média de 3 registros com diferença máxima de 10 mmHg, sendo descartados os registros associados à influências causadas por movimentos dos animais.

### **3.2.3 Dissecção das artérias coronárias**

Após 10 semanas de idade, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50mg/kg/ via intraperitoneal) e posteriormente eutanasiados por decapitação. O tórax foi aberto e o coração retirado e mantido em uma solução

nutriente composta de NaCl, 120mM; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1,25mM; KCl, 5,4mM; MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O, 2,5mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .H<sub>2</sub>O, 2,0mM; NaHCO<sub>3</sub> , 27,0mM; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,2mM; EDTA, 0,03mM e glicose 11,0mM com pH 7.4 durante o procedimento de dissecação. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e o ramo septal foram isolados com o auxílio de um microscópio de dissecação (F. Vasconcelos M900, São Paulo, Brasil) livre de tecido muscular ventricular circundante e congelado a -80 °C até sua utilização.

### **3.2.4 Western Blotting**

A técnica utilizada para detecção da expressão do GPER, NADPH oxidase (gp91phox, subunidade catalítica do complexo), catalase e superóxido dismutase-2 (SOD-2) foi a de Western Blotting (n = 8 por grupo).

#### **3.2.4.1 Extração das proteínas**

Após a dissecação das coronárias, estas foram mantidas a -80 °C até o momento da extração proteica, que foi realizada em 130 µL de tampão de lise (10 mM Tris – HCl pH 7,4, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 1 % SDS, 0,5 mM DTT, 5 mM EDTA, 1mM PMSF), ao qual se adicionou 10 µg/mL coquetel inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de sonificador ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4 °C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80 °C. Este extrato total foi utilizado para avaliação da expressão do GPER, SOD-2, catalase e NADPH oxidase (gp91phox).

#### **3.2.4.2 Dosagem das proteínas**

A determinação do conteúdo de proteína total foi feita utilizando-se o método de Lowry (Lowry et al., 1951). Preparou-se o reagente A (48:1:1 – carbonato de

sódio 3 % com 0,1 M de NaOH, tartarato de sódio/potássio 4 % e sulfato de cobre 2 %, respectivamente) e o reagente B (reagente de Folin-fenol Ciocalteu – 1:3 em água). A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1 mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão, em que as diluições continham de 5 a 80 µg de proteína. Alíquotas dos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos (5 µL) foram utilizadas para as dosagens. Todos os tubos de ensaio foram completados para um volume final de 250 µL, sendo posteriormente adicionados 2,5 mL da solução A. Após 10 minutos, se adicionou 0,25 mL da solução B. A absorbância foi medida a 660 nm depois de 10 minutos. Todas as dosagens foram feitas em duplicata.

#### 3.2.4.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

De forma a se alcançar a otimização das condições para o ensaio do western blot, experimentos preliminares foram realizados a fim de se definir as melhores condições de separação, qualidade da banda e diluições do anticorpo. Dessa forma, diferentes quantidades de extratos proteicos foram utilizadas dependendo da proteína a ser detectada. As amostras foram submetidas à SDS-poliacrilamida, 10% preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS, e o gel de empacotamento 4% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,1 % de SDS.

As amostras foram aplicadas nos géis na presença de tampão de amostra (Tris HCl, SDS, glicerol, DTT e azul de bromofenol). Antes da sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1 % de SDS), a 80 volts. Os procedimentos relativos à eletroforese foram realizados segundo o sistema descrito por Laemmli (1970).

#### 3.2.4.4 Transferência das proteínas

Depois de separadas, as proteínas das amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando um sistema de transferência realizada em cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4 °C com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20 % (v/v) de metanol, por 55 minutos a 10 volts.

#### 3.2.4.5- Incubação dos anticorpos

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado (5 %) em tampão TBS-tween 0,1 % (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação, em TBS-T e adicionado os seguintes anticorpos primários para GPER (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), SOD-2 (1:500, BD Biosciences), catalase (1:2500, Sigma Aldrich), gp91phox (1:2000, BD Biosciences) e  $\beta$ -actina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1 %, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase alcalina - 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1:30 hora, à temperatura ambiente, sob agitação leve, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1 %, e posteriormente com tampão TBS.

A detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada utilizando-se o Kit comercial NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas tiveram suas imagens

digitalizadas e tratadas utilizando o programa Image J (domínio público). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle ( $\beta$ -actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

### 3.2.5 Dihidroetídio (DHE)

Artérias coronárias foram isoladas, limpas e dissecadas dos tecidos aderentes e imediatamente congeladas em líquido de crioproteção (Tissue Tek - OCT). Os blocos contendo as artérias coronárias foram armazenados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do preparo das lâminas, no criostato ( $-25^{\circ}\text{C}$ , sem iluminação; lâminas de  $10\text{ }\mu\text{m}$  de espessura). As lâminas foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento dos experimentos.

Para a análise da fluorescência emitida pelo DHE, os cortes de artéria coronária foram lavados com solução de Hanks completa modificada (em mmol/L:  $\text{CaCl}_2$  1,6;  $\text{MgCl}_2$  1,0; NaCl 120,0; KCl 5,0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5; glicose 10,0; HEPES 10,0; pH 7,4). A seguir, os cortes foram incubados com DHE (seletiva para EROs,  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  por 30 min em temperatura ambiente). Após o tempo de incubação, foi realizada a lavagem dos cortes, utilização de lamínulas (Knittel Glaser,  $24\times 50\text{ mm}$ ) e visualização no microscópio confocal (Leica TSC SP5), onde foram adquiridas as imagens, focadas usando objetiva de imersão em óleo (aumento de 63x). O software de análise *Leica Application Suite – Advanced Fluorescence Lite 2.3.0 (LAS-AF Lite, Leica Microsystems, 1997-2010)* foi utilizado para capturar as imagens dos cortes no modo xyz, com análise sequencial, bidirecional -29,49, em 200 Hz no formato de  $1024\times 1024$ , com zoom de 1,10x, no modo de aquisição *TCS SP5*. Fotomicrografias de 3 a 5 animais por grupo foram analisadas com o software *ImageJ* (1.46r, NIH, USA), pela utilização de áreas do mesmo tamanho para o músculo liso vascular (MLV) (retângulos de  $1,00\times 0,60$ , de 5 regiões diferentes no MLV).



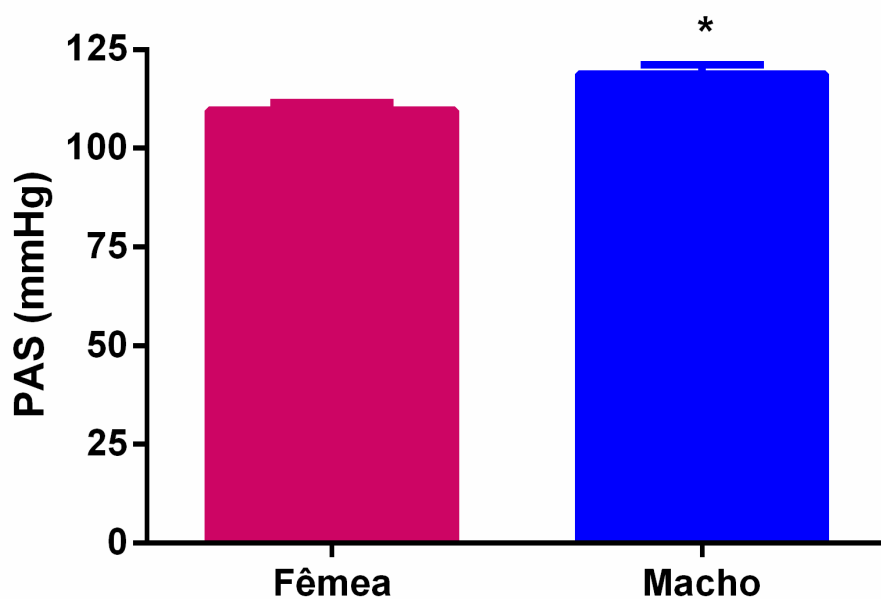
### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada pelo programa estatístico Graph-Pad Prism 6. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Teste t não pareado foi utilizado quando necessário. Para a análise da resposta vasodilatadora ao G1 foi utilizada a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). Para verificar entre quais grupos houve diferenças utilizamos o teste *post hoc* Bonferroni, e considerado como significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

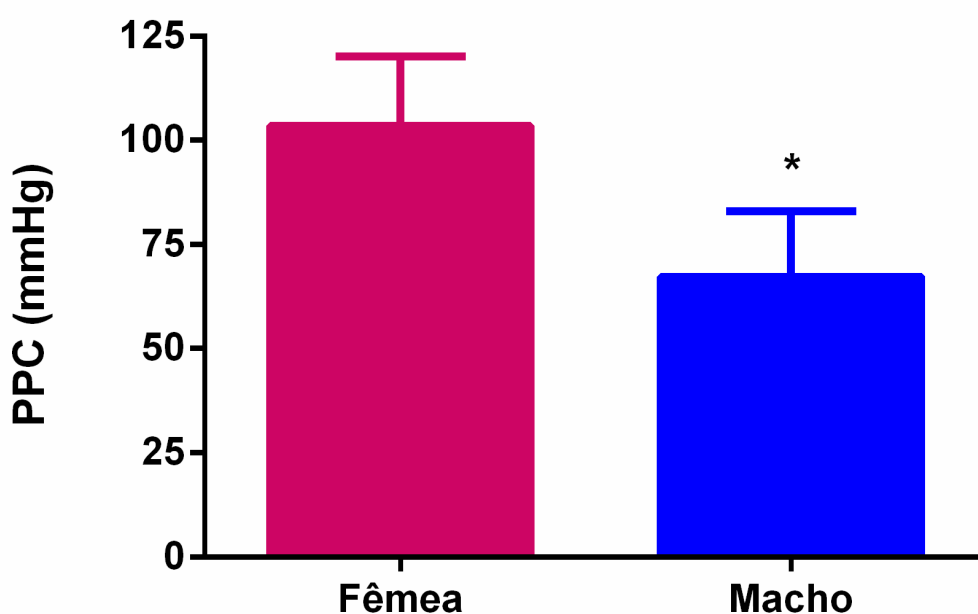
Na figura 3 observamos valores referentes à pressão arterial sistólica (PAS) de ratos de ambos os sexos. Pudemos observar que a PAS foi significativamente maior nos machos ( $119 \pm 2$  mmHg) quando comparado às fêmeas ( $110 \pm 2$  mmHg).



**Figura 3:** Pressão arterial sistólica em fêmeas ( $n = 11$ ) e machos normotensos ( $n = 11$ ). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. . \* $p < 0,05$  comparado com as fêmeas.

## 4.2 PRESSÃO DE PERFUSÃO CORONARIANA (PPC)

Na figura 4, mostramos os valores basais de pressão de perfusão coronariana (PPC) em ratos de ambos os sexos. Diferente do observado com a PAS, a PPC basal foi significativamente maior em fêmeas ( $103 \pm 3$  mmHg) do que nos machos ( $67 \pm 3$  mmHg).



**Figura 4:** Valores basais de pressão de perfusão coronariana (PPC) em corações de fêmeas (n=53) e machos (n=54). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado às fêmeas.

O importante papel dos mediadores endoteliais para manutenção do tônus vascular coronariano também foi estudado e é destacado nas tabelas 1 e 2 que nos mostram os valores de PPC após adição à solução nutritora dos inibidores para formação de fatores de relaxamento derivados do endotélio de modo individual ou combinado e a PPC após bloqueio inespecífico dos canais para potássio com TEA.

Em fêmeas, observamos um aumento significativo da PPC após as inibições individuais (tabela 1) ou combinadas (tabela 2) em relação à PPC basal, mostrando o importante papel do NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF na regulação do tônus coronariano neste grupo. O bloqueio inespecífico dos canais para potássio com TEA também causou aumento na PPC em fêmeas.

Já em machos, houve aumento significativo da PPC somente após a inibição com L-NAME (tabela 1) e após inibição associada do NO + PGI<sub>2</sub> e NO + EDHF com L-NAME + indometacina e L-NAME + clotrimazol, respectivamente. (tabela 2). O aumento observado na PPC provavelmente resultou da inibição da NOS, uma vez que a inibição da CYP e da COX parece não ser capaz de alterar a PPC em machos. A inibição tripla dos fatores de relaxamento derivados do endotélio e o bloqueio inespecífico dos canais para potássio com TEA também foram capazes de aumentar significativamente a PPC em machos (tabela 2).

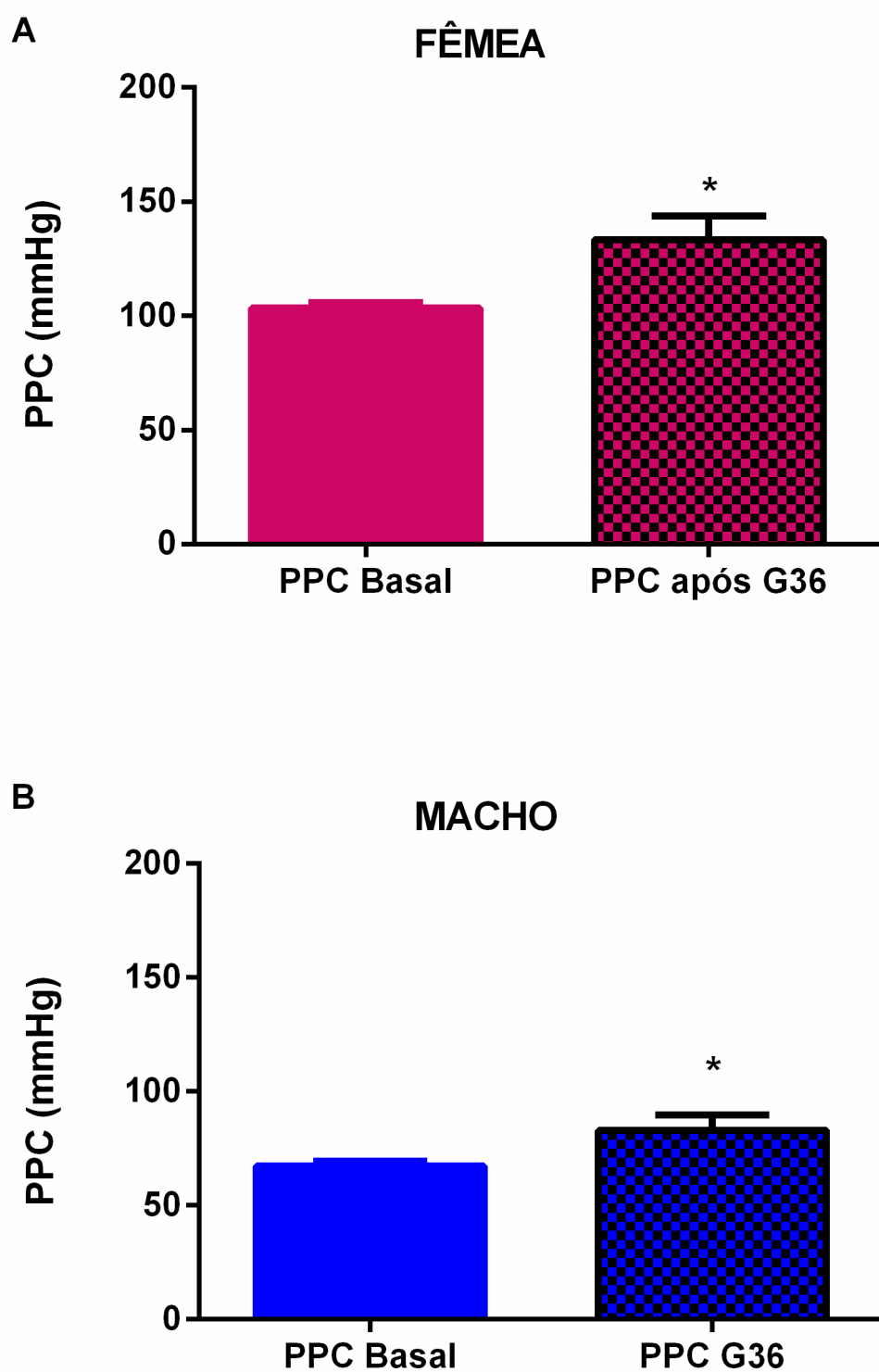
GRUPOS	CONTROLE		L-NAME		INDO		CLOT	
	N	PPC mm/Hg	N	PPC mm/Hg	N	PPC mm/Hg	N	PPC mm/Hg
<b>FÊMEA</b>	(53)	103±6	(9)	175±6*	(9)	153±9*	(7)	124±7*
<b>MACHO</b>	(54)	67±7	(8)	127±9*	(7)	76±2	(10)	77±7

**Tabela 1:** Pressão de perfusão coronariana (PPC, mmHg) de ratos após inibições com: L-NAME (100 µM), indometacina (INDO) (2,8 µM), clotrimazol (CLOT) (0,75 µM). Os valores foram expressos com média ± EPM. \* $p < 0,05$  comparados com respectivo controle.

GRUPOS	CONTROLE		L-NAME + INDO		L-NAME + CLOT		L- NAME+ INDO+ CLOT		TEA	
	N	PPC mm/Hg	N	PPC mm/Hg	N	PPC mm/Hg	N	PPC mm/Hg	N	PPC mm/Hg
<b>FÊMEA</b>	(53)	103±6	(7)	171±9*	(7)	147±5*	(8)	157±7*	(7)	136±7*
<b>MACHO</b>	(54)	67±7	(7)	130±5*	(7)	117±9*	(8)	108±9*	(8)	97±9*

**Tabela 2:** Pressão de perfusão coronariana (PPC, mmHg) de ratos após inibições com: L-NAME (100  $\mu$ M) + indometacina (INDO) (2,8  $\mu$ M), L-NAME + clotrimazol (0,75  $\mu$ M). L-NAME + INDO + (CLOT) ou TEA. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparados com respectivo controle.

A figura 5 mostra os valores de PPC antes e após o bloqueio com antagonista específico do GPER (G36). Observamos um aumento significativo da PPC após a adição do G36 à solução nutritora, tanto em fêmeas (5A) ( $103 \pm 3$  para  $133 \pm 10$  mmHg) quanto em machos (5B) ( $67 \pm 3$  para  $83 \pm 7$  mmHg), mostrando pela primeira vez a importante contribuição desse receptor na modulação do tônus coronariano de ratos de ambos os sexos.



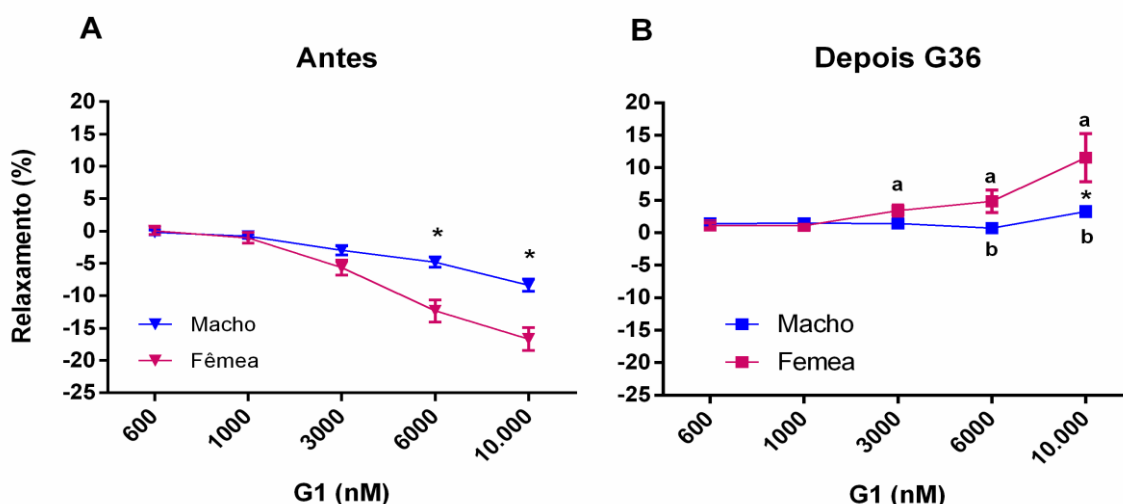
**Figura 5:** Valores basais de pressão de perfusão coronariana (PPC) em corações de fêmeas (5A) (n=7) e machos (5B) (n=7) antes e após o bloqueio do GPER com seu antagonista específico G36. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparados a PPC basal.

### 4.3 REATIVIDADE DO LEITO VASCULAR CORONARIANO

O principal objetivo desse estudo foi avaliar a reatividade vascular coronariana de ratos de ambos os sexos com o agonista do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (G1). Para isso, uma curva de relaxamento foi construída com concentrações de G1 administradas diretamente no leito vascular coronariano de ratos (figura 6).

Como pode ser observado na figura 6A, houve progressivo relaxamento no leito coronariano em resposta ao G1 em ambos os grupos. No entanto, a resposta vasodilatadora foi significativamente maior nas fêmeas.

A resposta vasodilatadora induzida pelo G1 foi revertida em resposta vasoconstritora quando foi adicionado à solução nutritora o antagonista específico do GPER, (G36) nos dois grupos estudados (figura 6B). A resposta vasoconstritora do G1 após inibição com G36 foi significativamente mais pronunciada em fêmeas.



**Figura 6-** Resposta vasodilatadora à concentrações de G1 (600-10.000nM) em ratos machos (N=20) e fêmeas (N=20) antes do G36 (A). (B) Resposta a concentrações de G1 após G36 em fêmeas, (N=7) e macho (N=7); \* $p < 0,05$  quando comparado com fêmea. <sup>a</sup> $p < 0,05$  quando comparado a curva fêmea antes do G36. <sup>b</sup> $p < 0,05$  quando comparado a curva macho antes do G36.

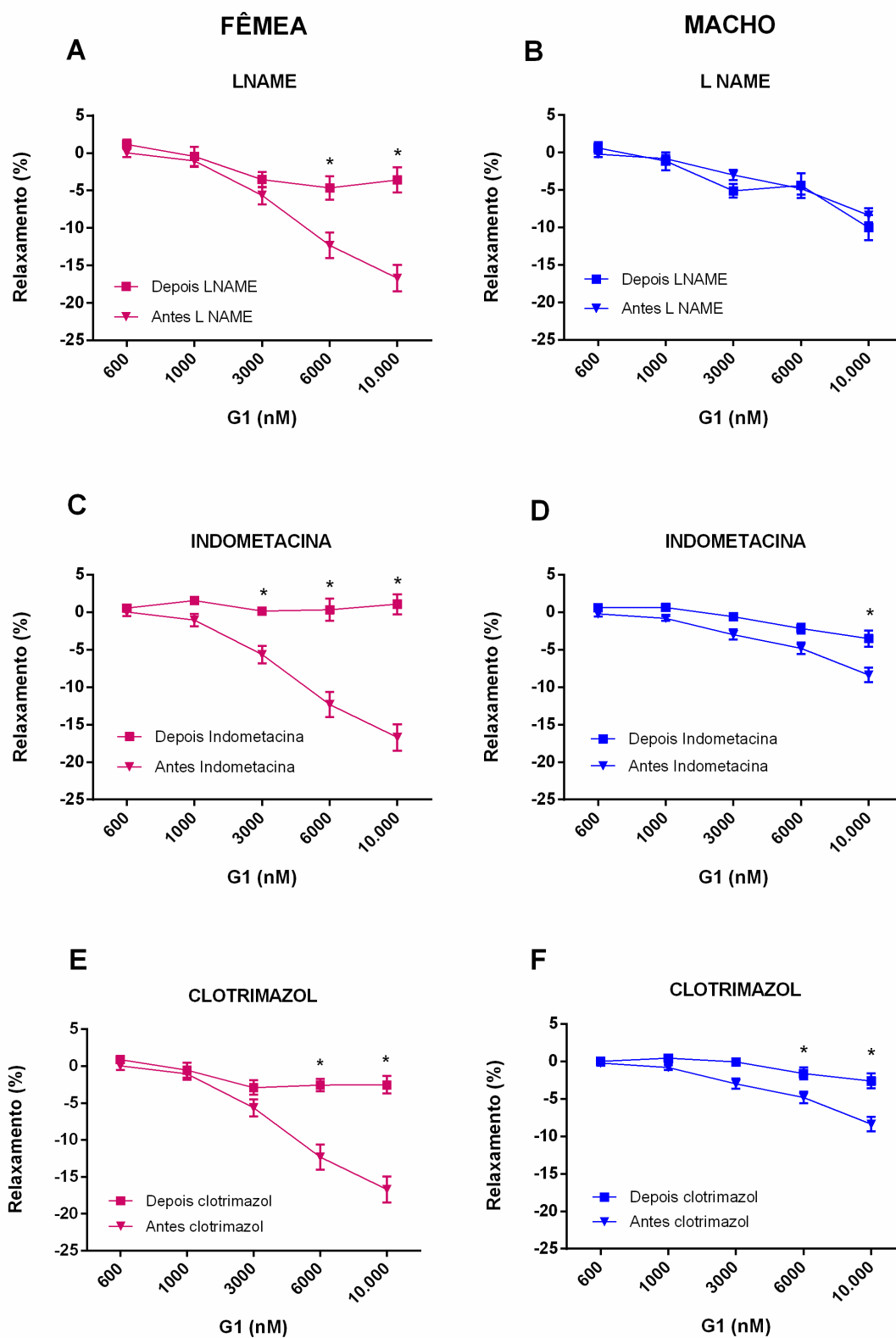
Para avaliar se há participação dos autacóides endoteliais na vasodilatação induzida pelo G1 no leito vascular coronariano de ratos, realizamos a inibição individual ou combinada das enzimas responsáveis pelos fatores de relaxamento derivado do endotélio (figura 7).

Quando inibida a enzima NOS com 100  $\mu$ M de L-NAME, pudemos observar uma redução na resposta vasodilatadora somente nas fêmeas (figura 7A), mostrando uma maior dependência desse grupo em relação à produção e liberação de NO. Nos machos não houve redução da resposta vasodilatadora após a inibição com L-NAME (figura 7B).

Na figura 7C pudemos observar que a vasodilatação induzida pelo G1 foi abolida em fêmeas após inibição dos derivados da ciclooxygenase com indometacina, mostrando uma importante contribuição da prostaciclina como mediador do relaxamento induzido pelo G1. Em contrapartida, em machos, a resposta vasodilatadora foi significativamente reduzida após essa inibição apenas na dose de 10.000 nM de G1 (figura 7D).

A inibição da CYP com clotrimazol (0,75  $\mu$ M) foi capaz de reduzir o relaxamento mediado pelo G1 nos dois grupos estudados (figura 7E e 7F), nas doses de 6.000 e 10.000 nM, sugerindo um importante papel do EDHF nesse modelo estudo.





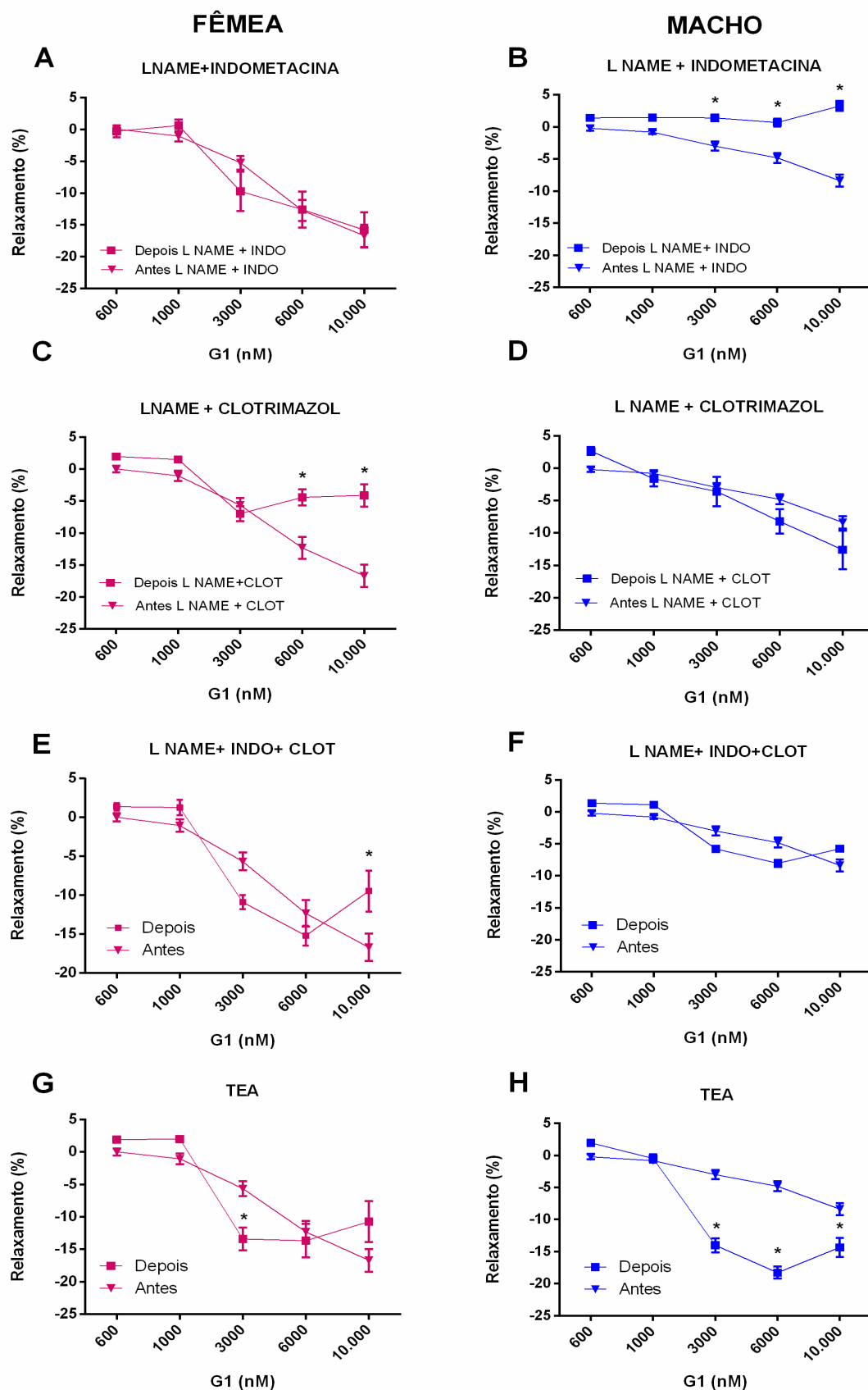
**Figura 7-** Resposta vasodilatadora às concentrações crescentes de G1 (600-10.000nM) antes e após a inibição com L- NAME (A, N=11) e (B, N= 8); indometacina (C, N= 9) e (D, N= 7) e clotrimazol (E, N=7) e (F, N=8). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado com a curva antes das inibições.

Na figura 8, observamos que a inibição conjugada com L-NAME + indometacina não alterou a resposta de relaxamento do G1 em fêmeas (figura 8A), no entanto, essa inibição reduziu significativamente o relaxamento nos machos nas doses 3.000, 6.000 e 10.000 nM de G1 (Figura 8B). Isso sugere que o EDHF foi capaz de manter o mesmo nível de relaxamento induzido pelo G1 apenas nas fêmeas.

A inibição combinada da NOS e CYP (Figura 8C) diminuiu de forma significativa o relaxamento induzido pelo G1 em fêmeas, nas doses de 6.000 e 10.000nM de G1, enquanto que nos machos (Figura 8D) não observamos nenhuma alteração na resposta, e isso sugere que a prostaciclina foi capaz de manter o mesmo nível de relaxamento induzido pelo G1 nos machos quando NOS e CYP estavam inibidos.

A inibição tripla dos autacóides endoteliais com LNAME, indometacina e clotrimazol reduziu a resposta vasodilatadora do G1 em fêmeas (Figura 8E) apenas na última dose (10.000nM), enquanto que em machos, o triplo bloqueio não modificou o padrão de vasodilatação (Figura 8F).

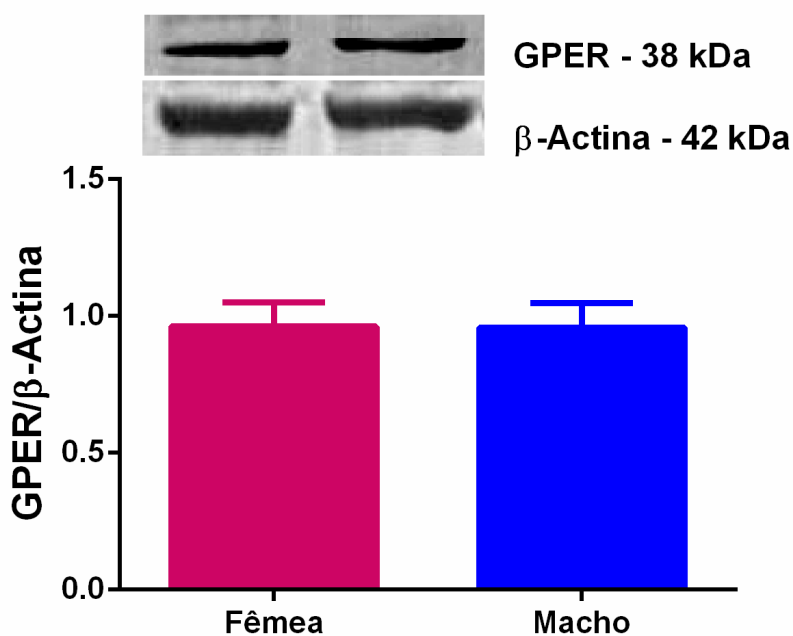
Diante destes resultados, optamos por avaliar a participação dos canais para potássio na resposta vasodilatadora induzida pelo G1 utilizando tetraetilamônio (TEA), um inibidor inespecífico desses canais. Em fêmeas, o relaxamento foi maior após a inibição com TEA na dose de 3.000 nM (figura 8G). De maneira similar ao que ocorreu com as fêmeas, em machos, a vasodilatação foi significativamente maior nas três últimas doses (Figura 8H).



**Figura 8-** Resposta vasodilatadora às concentrações crescentes de G1 (600-10.000nM) antes e após a inibição com L- NAME+ indometacina (A, N=7) e (B, N= 7); L NAME + clotrimazol (C, N= 7) e (D, N= 7); L NAME+ indometacina + clotrimazol (E, N=8) e (F, N=8) e TEA (G, N= 8) e (D, N=8). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparados com a curva antes das inibições.

#### 4.4 EXPRESSÃO DO RECEPTOR GPER

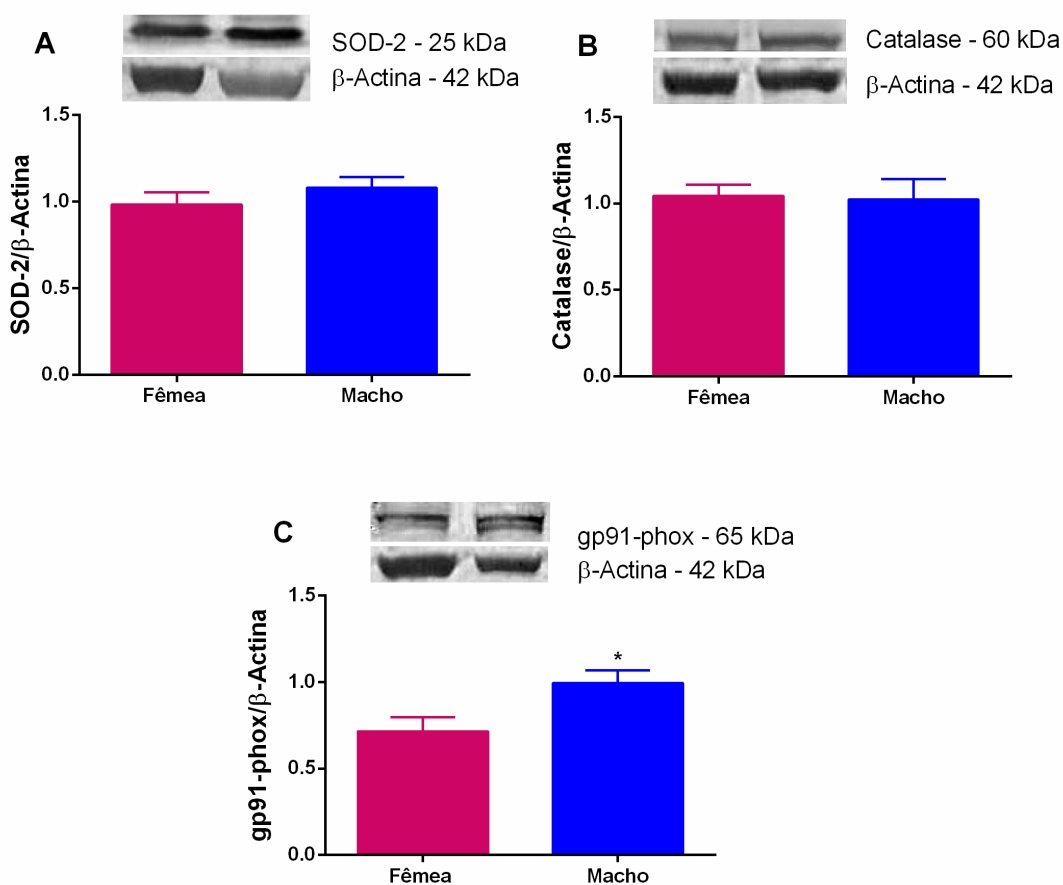
A figura 9 mostra a expressão relativa da proteína GPER em artérias coronárias obtidas de fêmeas e machos Wistar. Encontramos uma importante banda de 38 KDa de GPER no material estudado. Além disso, a quantificação do Western Blotting revelou que ambos os grupos expressam quantidades similares desse receptor.



**Figura 9:** Análise de expressão protéica do GPER em fêmeas (n=8) e machos (n=8) Wistar. Os dados foram expressos como média ± EPM. \*p< 0,05 comparados com fêmeas.

## 4.5 EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

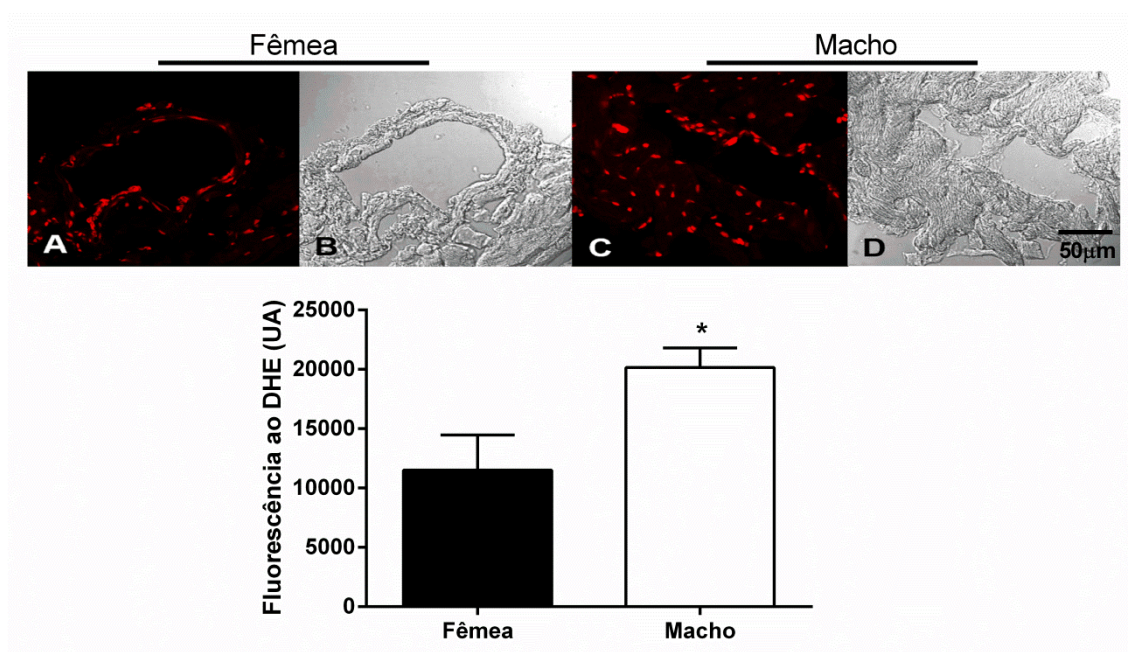
Ao analisar a expressão protéica de enzimas antioxidantes (SOD-2, catalase), observamos que ambos os grupos apresentaram quantidades similares dessas proteínas (10A e 10B). Em relação à subunidade da NADPH oxidase (gp91phox) nosso resultado mostrou que os machos expressam quantidades significativamente maiores gp91phox em relação as fêmeas (Figura 10C).



**Figura 10:** Análise da expressão protéica em ratos fêmeas e machos (A) SOD-2 (B) Catalase, (C) gp91phox, n=8 em cada grupo. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparados com fêmeas.

#### 4.6 MEDIDA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO – DIHIDROETÍDIO- DHE

Na figura 11 mostra a análise da fluorescência produzida pela oxidação com DHE em artérias coronárias de fêmeas (A após e B antes da fluorescência) e machos (C após e D antes da fluorescência). Nosso resultado demonstrou um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nos ratos machos quando comparado as fêmeas.



**Figura 11:** Imagens de microscopia da fluorescência emitida por dihidroetídeo em artérias coronárias de ratos fêmeas (B) antes (A) após a fluorescência (N=4) e machos (D) antes (C) após a fluorescência (N=5). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparados com fêmeas.

## 5. DISCUSSÃO

A principal descoberta do trabalho foi que o G1, agonista seletivo do GPER, foi capaz de promover relaxamento do leito coronariano de ratos normotensos, de ambos os sexos, por meio de diferentes mediadores endoteliais, sendo essa resposta mais pronunciada em fêmeas, o que justificaria o uso dessa substância em esquemas de terapia na pós-menopausa.

Também foram observadas diferenças nos valores de PAS entre os grupos estudados, sendo maiores em machos do que em fêmeas. A maioria dos trabalhos tem demonstrado essa diferença de gênero associada à PAS em modelos de hipertensão experimental, como em ratos espontaneamente hipertensos (Ganten et al., 1989; Cheng e Meng et al., 1991; Reckelhoff et al., 2000) e ratos Dahl sensíveis aos sal (Rowland e Fregly et al., 1992, Crofton et al., 1993) e também em estudos clínicos, onde os indivíduos do sexo masculino exibiam maior nível de pressão arterial (sistólica e diastólica) em comparação aos seus congêneres de idade similar (Ong et al., 2008). Ao contrário, não foi detectada diferença de gênero na PAS de ratos Lewis normotensos (Pendergrass et al., 2008; Lindsey et al., 2013a).

São escassos os dados na literatura demonstrando o dimorfismo sexual e sua relação com a PAS em animais normotensos e diante disso, optamos por mostrar essa relação em nosso estudo. No entanto, embora os mecanismos responsáveis pelo controle da pressão arterial em ambos os sexos não estejam claros, há evidências significativas de que os hormônios sexuais desempenhem um papel importante nesta diferença (Reckelhoff, 2001).

Estudos sugerem que a testosterona, o principal hormônio sexual masculino, pode estimular o sistema renina- angiotensina- aldosterona (SRAA), que pela formação de AII e sua interação direta com o receptor AT-1, abundantemente expresso em todo o corpo, pode elevar a pressão arterial (Fischer et al., 2002), contraindo a musculatura lisa vascular (Reid, 1992), o que poderia justificar uma maior PAS encontrada em ratos machos.

Ao contrário, a menor PAS encontrada em fêmeas corrobora com o fato de que o estrogênio desempenha um papel cardioprotetor na manutenção dos níveis pressóricos. Uma das explicações deste efeito seria a influência do hormônio feminino sobre o SRAA. O estrogênio diminui a atividade da renina no plasma (Schunkert et al., 1997), reduz a concentração de RNAm da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Gallagher et al., 1999), além de regular negativamente o receptor AT1 (Matsusaka e Ichikawa 1997) em células de músculo liso vascular (Nickenig et al., 2000) e córtex adrenal (Roesch et al., 2000). O estrogênio pode atuar reduzindo a resistência vascular periférica (De Ziegler et al., 1991) e estimulando a liberação de mediadores endoteliais como o NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF (Santos et al., 2004), consequentemente mantendo a PAS em níveis menores em fêmeas quando comparado aos machos como mostrado em nosso estudo. Além de seu papel como liberador de mediadores endoteliais, estudos mostraram que o estrogênio também possui propriedades antioxidantes promovendo aumento da atividade da enzima SOD e/ou redução da enzima NADPH oxidase e ânion superóxido (Arnal et al., 1996; Wagner et al., 2001; Strehlow et al., 2003)

Outra observação importante foi a diferença na PPC basal entre os grupos, onde fêmeas exibiram uma PPC basal significativamente maior, similar ao que foi observado em animais normotensos (Moysés et al. 2001; Santos et al. 2004) e em animais hipertensos (Santos et al., 2010) em estudos prévios de nosso laboratório. Não sabemos ao certo o(s) mecanismo(s) que explicariam essa PPC maior em fêmeas em relação aos machos, mas acreditamos que uma PPC mais elevada seria uma vantagem para esse grupo, pois com um tônus mais elevado a resposta vasodilatadora seria mais pronunciada. Um estudo realizado por Figueroa-Valverde et al. (2011) demonstraram que o estradiol aumentou significativamente a pressão de perfusão e a resistência coronariana em corações isolados de ratas intactas, devido ao aumento dos níveis de cálcio por meio da ativação dos canais de cálcio tipo L, via mecanismos moleculares não-genômicos. Diante disso, sugerimos que o dimorfismo sexual em relação ao tônus basal mais elevado em fêmeas encontrado em nosso estudo, possa



estar associado ao estrogênio, porém, estudos adicionais serão necessários para elucidar esse achado.

Nosso estudo demonstrou também que o GPER foi capaz de modular o tônus vascular coronariano de ratos normotensos. Ao adicionar a solução nutritiva o antagonista específico do GPER, G36, observamos uma elevação significativa da PPC tanto em machos quanto em fêmeas. É a primeira vez que esse resultado é demonstrado, embora alguns estudos tenham destacado que o GPER tem a capacidade de modular o tônus arterial sistêmico (Han et al., 2013). Nosso estudo, por sua vez, foi realizado sob condições muito próximas às fisiológicas, isto é, em coração isolado, com leito vascular íntegro e sem contração prévia.

Embora tenhamos observado diferenças na PPC basal de machos e fêmeas e na PAS, nosso foco central foi avaliar a ação do G1 no leito vascular coronariano de ratos normotensos já que até o momento a ação vasodilatadora resultante da ativação do GPER foi destacada apenas em vasos isolados. Autores afirmam que o GPER relaxa tanto artérias de resistência quanto artérias de condutância de vários tecidos em diferentes espécies, sendo esse relaxamento mais pronunciado em artérias de resistência (Lindsey et al., 2011).

Nossos resultados mostraram pela primeira vez que a administração aguda do G1 foi capaz de promover vasodilatação no leito vascular coronariano de corações isolados de ratos de ambos os sexos, corroborando com o que foi encontrado por Santos et al., (2004) utilizando o 17  $\beta$ -estradiol. Em vasos isolados, diversos estudos já demonstraram o G1 agindo como vasodilatador. Por exemplo, G-1 dilata agudamente artérias mamárias internas de humanos (Haas et al., 2007), artérias coronárias de suínos (Meyer et al., 2010), artéria aorta (Lindsey et al., 2009 e Lindsey et al., 2011), artérias mesentéricas (Lindsey et al., 2011), bem como artérias carótidas de ratos (Broughton et al., 2010) e murinos machos e fêmeas (Haas et al., 2009).

Nosso estudo mostrou também uma diferença no relaxamento induzido pelo agonista GPER entre os grupos estudados. A vasodilatação do leito coronariano induzida pelo G1 foi significativamente maior em fêmeas do que em machos como foi observado por Santos et al., (2004), ao administrar agudamente 17 $\beta$ -estradiol no leito coronariano de ratos normotensos. As respostas encontradas nestes estudos provavelmente foram mediadas pelo GPER, uma vez que em ambos os casos as respostas eram rápidas e ocorriam cerca de 30 segundos após a aplicação do G1 ou 17  $\beta$ -estradiol.

Essa mesma diferença de gênero na resposta de relaxamento foi demonstrada por outro autor utilizando G1 ou estrogênio em artérias mesentéricas de ratos *in vitro* (Lindsey et al., 2013a) . Em artérias de resistência de humanos, o relaxamento induzido pelo G1 também foi significativamente maior em vasos de mulheres na pós-menopausa do que nos vasos de homens da mesma idade (Arefin et al., 2014). Ao contrário, em artérias carótidas (Broughton et al., 2010) e arteríolas cerebrais de ratos Sprague-Dawley (Murata et al., 2013) não houve diferença de gênero na respostas de relaxamento induzido pelo G1.

Para sabermos se a maior resposta vasodilatadora ao G1 encontrada no coração isolado de fêmeas era devido à maior expressão do GPER nas coronárias deste grupo, optamos por quantificar essa proteína pelo método de Westen Blotting. Observamos que ambos os grupos estudados expressaram quantidades similares de GPER conforme mostrado na Figura 9. Outros estudos também já encontraram esse resultado. Por exemplo, não houve diferença na expressão do GPER no cérebro de ratos Sprague-Dawley de ambos os sexos com 10 semanas de idade (Matsuda et al., 2008), nem em cardiomiócitos de ratos dessa mesma linhagem (Deschamps e Murphy et al., 2009). Ao contrário, a expressão do GPER em artérias mesentéricas de ratos Lewis mRen2 fêmeas, foi maior do que em machos da mesma linhagem (Lindsey et al., 2013a).

Pelo fato de não encontrarmos diferença na expressão do GPER em coronárias de ratos machos e fêmeas, decidimos avaliar se a menor dilatação

encontrada em machos após o uso do G1 poderia ser devido ao aumento do estresse oxidativo, uma vez que a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROS) pode causar um prejuízo na resposta vascular pela interação com os principais fatores responsáveis pelo relaxamento vascular (Zou e Ulrich, 1996; Liu et al., 2002 e Fosterman, 2010). Desse modo, avaliamos a expressão das enzimas antioxidantes SOD-2 e Catalase, e da isoforma gp91-phox do complexo enzimático da NADPH oxidase, assim como estresse oxidativo *in situ* pela fluorescência ao DHE.

As enzimas antioxidantes (SOD, catalase e glutathione peroxidase) consistem na primeira linha de defesa frente à produção de espécies reativas de oxigênio. Estas enzimas evitam o acúmulo de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção do radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (Yu, 1994).

As superóxidos dismutases (SOD1, SOD2 e SOD3), são metaloenzimas que catalisam muito eficientemente a dismutação de dois íons superóxido para formar peróxido de oxigênio e oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1999). A catalase está envolvida na eliminação do peróxido de hidrogênio e pode ser inativada pelo ânion superóxido. Além disso, a catalase participa da desintoxicação de altas concentrações de  $H_2O_2$  (Zhang e Tan, 2000). Em nosso estudo, não observamos diferenças significativas na expressão destas enzimas nas coronárias dos dois grupos. A expressão da SOD-2 também não foi diferente em artérias basílicas de ratos Sprague-Dawley de ambos os sexos (Miller et al., 2007). No entanto, a expressão da catalase na medula renal de machos SHR foi maior quando comparado as fêmeas da mesma idade (Sullivan et al., 2007)

A NADPH oxidase é a principal enzima formadora de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) o qual possui grande citotoxicidade e tem atividade envolvida na gênese de processos patológicos como hipertensão arterial, *diabetes mellitus* e aterosclerose. É um complexo enzimático que possui várias subunidades,

como a p22phox, gp91phox, p47phox, p67phox, p40phox e uma pequena guanosina trifosfato (GTP) ligada à proteína Rac (Cai e Harrison, 2000).

Em nosso estudo, a expressão da subunidade gp91phox foi maior nos machos, o que poderia levar a uma maior geração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a fluorescência emitida pelo DHE também foi maior neste grupo, indicando que em machos, a maior produção de espécies reativas, pode ser uma provável causa da menor resposta ao G1 encontrado neste estudo. Alguns autores demonstraram que a testosterona é um estimulador da formação de AII, (como já mencionado nesta discussão), que ao se ligar aos receptores AT-1 promoveria a estimulação do complexo NADPH oxidase, que por sua vez aumentaria a concentração de espécies reativas de oxigênio, o que explicaria uma maior produção de espécies reativas encontrado em nosso estudo e justificaria a vulnerabilidade dos machos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Kienitz e Quinkler, 2008; Förstermann, 2010).

Para confirmar que a resposta vasodilatadora encontrada no leito coronariano era de fato mediada pelo GPER, nós optamos por inibir esse receptor com o seu antagonista específico (G36). O G36 aboliu a vasodilatação induzida pelo G1 em machos e surpreendentemente converteu a resposta vasodilatadora de fêmeas em resposta vasoconstritora, confirmando o envolvimento do GPER nessa ação. No entanto não sabemos por que ocorreu essa vasoconstrição após a inibição do GPER em fêmeas, pois, como em machos, esperávamos que a resposta fosse apenas abolida.

Estudos recentes utilizando o G15, outro antagonista do GPER, porém menos seletivo que o G36, indicaram que a inibição farmacológica do GPER pode atenuar o relaxamento vascular induzido pelo 17  $\beta$ -estradiol ou pelo G1 em anéis de aorta de ratos fêmeas Lewis mRen2 (Lindsey et al., 2011) e em artérias coronárias de suínos (Yu et al., 2011). Apesar da literatura já ter descrito que o G36 é o antagonista mais seletivo do GPER (Dennis et al., 2011), sua utilização em pesquisas ainda é pobremente encontrada.

Após constataremos em nosso estudo que o G1 relaxava o leito vascular coronariano de ratos de ambos os sexos e que essa resposta era de fato via GPER, o próximo passo foi verificar se essa vasodilatação teria a participação de mediadores endoteliais. Como alguns estudos haviam mostrado que ação vasodilatadora do G1 ocorre graças à liberação de autacóides endoteliais (Broughton et al., 2010; Lindsey et al., 2013a), buscamos identificar quais seriam os possíveis mediadores envolvidos nessa ação, o que até então não havia sido feito no leito coronariano de ratos tendo o G1 como indutor do relaxamento.

O endotélio, palavra que advém do grego como junção das palavras *endon* (interior) e *thele* (mamilo) (Évora, 1999), é uma camada de células finas que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, que durante muitos anos foi considerado um mero separador de superfícies (Cardoso et al., 1994; Batlouni, 2001).

Os primeiros autores que demonstraram com clareza o papel do endotélio foram Furchgott e Zawadzki, (1980). Eles observaram que, em algumas preparações isoladas de anéis de aorta torácica de coelhos, a acetilcolina não produzia a vasodilatação, mas, sim, vasoconstrição. No entanto, isto ocorria devido à retirada involuntária do endotélio vascular durante a preparação do vaso. Estudos subsequentes revelaram que esse relaxamento causado pela acetilcolina e outras substâncias como histamina e bradicinina envolvia a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, que foi nomeado de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (Furchgott et al., 1984). Ainda na década de 80, foi estabelecido que o EDRF era o NO (Ignaro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

O endotélio normal secreta NO, que age fazendo vasodilatação nas células do músculo liso vascular, previne a adesão e agregação plaquetária exerce efeitos antiinflamatórios, antiproliferativos e efeitos antimigratórios sobre os leucócitos, células endoteliais e células do músculo liso vascular (Hermann et al., 2006).

Diversos estudos apontaram uma relação entre o GPER e o NO. O GPER foi originalmente clonado como um receptor acoplado a proteína G, órfão, após indução pelo estresse de cisalhamento em células endoteliais humanas (Takada et al., 1997). O estresse de cisalhamento é um forte indutor da expressão da enzima responsável pela produção do vasodilatador NO (Fleming 2010), sugerindo que a função do GPER possa ser ligada à via do NO/L arginina (Meyer et al., 2011). Diante disso, nós realizamos a inibição aguda da oxido nítrico sintase (NOS) com L-NAME (100  $\mu$ M) e verificamos que a inibição da NOS foi capaz de reduzir de forma significativa a vasodilatação induzida pelo G1 somente nas fêmeas (Figura 7A), não havendo alteração significativa nos machos do mesmo grupo (Figura 7B). Esse resultado mostrou uma maior dependência das fêmeas em relação à liberação de NO para mediar a ação vasodilatadora aguda induzida pelo G1 e, alguns autores já haviam destacado essa diferença. No leito coronariano de ratos normotensos, o relaxamento induzido pelo 17  $\beta$ -estradiol foi reduzido após inibição da síntese de NO em fêmeas, mas não em machos (Santos et al., 2004). Em vasos isolados, essa dependência do NO para o relaxamento induzido pelo G1 foi observada em artérias mesentéricas de ratas mRen2, mas não em machos da mesma linhagem (Lindsey et al., 2013a) e em artérias de resistência de gestantes e mulheres na pós menopausa, mas não em homens com idade similar (Arefin et al., 2014). No entanto, a ativação do GPER induzida pelo G1 provocou relaxamento em artérias carótidas (Broughton et al., 2010) e arteríolas cerebrais de ratos Sprague-Dawley de ambos, machos e fêmeas (Murata et al., 2013), via liberação de óxido nítrico derivado do endotélio. Ao contrário, alguns autores destacaram ainda que o relaxamento induzido pelo G1 em artérias coronárias de suínos não foi afetado pelos inibidores de síntese de óxido nítrico ou guanilato ciclase, sugerindo fortemente um mecanismo independente NO / GMPc nesta ação (Yu et al., 2011). Portanto, existe uma grande heterogeneidade, quanto ao real papel do NO em mediar o relaxamento vascular induzido pelo GPER.

Já está bem descrito que a liberação do NO dependente do endotélio estimulada pelo estrogênio é resultado da rápida ativação da Akt/PI3K e

subsequente fosforilação da NO sintase endotelial (eNOS) (Haynes et al., 2000; Simoncini et al., 2000), embora outros mecanismos tenham sido propostos (Chow et al., 2010). Acredita-se que esse efeito seja mediado por subpopulações do RE $\alpha$  e possivelmente via RE $\beta$  se localizam nas invaginações vesiculares da membrana plasmática denominadas cavéolas (Simoncini et al., 2000; Chambliss et al., 2002). No entanto, estudos recentes têm demonstrado um envolvimento do GPER na fosforilação da eNOS e liberação de NO (Filice et al., 2009). O GPER uma vez ativado por seu ligante específico ou pelo estrogênio ativaria uma sequência de vias de sinalização envolvendo serina treonina quinase (C-Src), metaloproteinases de matriz (MMP), fosforilação e ativação do receptor do fator de crescimento epidermal ligado à heparina (EGFR), ativação da Akt e fosforilação da eNOS com consequente liberação de NO (Meyer et al., 2011; Jang et al., 2013).

Nossos resultados mostraram também que o NO desempenha um papel importante na regulação do tônus coronariano, pois após a inibição da eNOS, houve uma elevação significativa na PPC basal de ambos os grupos estudados (Tabela 2). Esse mesmo resultado já foi demonstrado em outros estudos realizados em nosso laboratório tanto em corações isolados de animais normotensos (Santos et al., 2004) quanto em animais hipertensos (Santos et al., 2010).

O fato da utilização de L-NAME ter reduzido de forma significativa a vasodilatação induzida pelo G1 somente nas fêmeas sugere que outro(s) mediador(es) endotelial(is) possa(m) estar envolvido(s) nessa ação. Assim sendo, analisamos a participação da PGI<sub>2</sub> e do EDHF.

Como em nosso estudo a inibição da COX com indometacina reduziu de forma significativa a vasodilatação induzida pelo G1, tanto em fêmeas quanto em machos, pudemos notar um importante papel dos prostanóides, provavelmente a PGI<sub>2</sub>, mediando o relaxamento induzido pelo G1, e uma maior contribuição da mesma em relação ao NO. Além disso, nossos resultados demonstraram que a PGI<sub>2</sub> parece desempenhar um papel importante na regulação do tônus

coronariano em fêmeas, pois após a inibição da COX, houve uma elevação significativa na PPC basal nesse grupo corroborando com estudos realizados previamente em nosso laboratório (Santos et al., 2004; Santos et al., 2010)

A prostaciclina, um produto da ciclooxygenase, é formada primariamente em células endoteliais e provoca o relaxamento do músculo liso vascular por meio da ativação da adenilatociclase e aumento da produção de monofosfato de adenosina cíclico 3', 5' (AMPc). Na maioria dos vasos sanguíneos, a contribuição de prostaciclina para o relaxamento dependente do endotélio parece não ser importante, a julgar pelo efeito limitado dos inibidores da ciclooxygenase sobre estas respostas. No entanto, a prostaciclina atua sinergicamente com NO para inibir a agregação plaquetária (Vanhoutte, 2003).

Alguns autores demonstraram o envolvimento dos estrogênios no aumento dos níveis de PGI<sub>2</sub>. Por exemplo, 17 β-estradiol (E<sub>2</sub>) aumenta a liberação de PGI<sub>2</sub> em uma variedade de vasos isolados tais como artérias coronárias epicardiais de humanos (Chester et al., 1995), artérias coronárias de suínos (Teoh et al., 2000), artérias carótidas de coelhos (Salom et al., 2002), aorta de ratos (Tepareenan et al., 2003), bem como em células endoteliais de artérias pulmonares de ovinos (Sherman et al., 2002). O E<sub>2</sub> aumenta também a resposta vasodilatadora mediada pelo REα em cultura de células de veias umbilicais humanas por aumentar a expressão da COX1 e consequentemente aumentar os níveis de PGI<sub>2</sub> (Sobrinho et al., 2010). A contribuição da PGI<sub>2</sub> para regulação do tônus vascular tem sido pouco descrita. Porém, a inibição da COX com indometacina elevou significativamente a PPC em corações isolados de ratos machos e fêmeas wistar (Santos et al., 2004) e SHR (Santos et al., 2010), ao contrário do que foi observado por Bauersachs et al. (1994), porém utilizando diclofenaco como inibidor da COX.

Pouco se sabe sobre a relação entre o GPER e a prostaciclina. Nosso estudo demonstrou que esse prostanóide parece participar da resposta vasodilatadora no leito coronariano de ratos normotensos de ambos os sexos, uma vez que após a inibição da COX houve redução do relaxamento nos dois grupos



estudados. Esse mesmo resultado foi encontrado por outro autor no leito vascular coronariano de ratos normotensos (Santos et al., 2004) e ratos SHR, utilizando o 17  $\beta$ -estradiol como indutor do relaxamento. Ao contrário, em experimentos realizados em artérias mesentéricas isoladas de ratos fêmeas Lewis (Lindsey et al., 2013b) e em arteríolas cerebrais de machos Sprague-Dawley (Murata et al., 2013), a inibição da COX com indometacina não foi capaz de reduzir vasodilatação induzida pelo G1. Dessa forma, a contribuição da PGI<sub>2</sub> mediando o relaxamento induzido pelo G1 parece variar de acordo com o tipo de espécie/linhagem e leito vascular estudado.

Ao longo dos últimos 15 anos, evidências sugerem que além do NO e PGI<sub>2</sub>, o endotélio produz um terceiro autacóide vasodilatador chamado de fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), que age fazendo hiperpolarização do músculo liso vascular e que é resistente a inibidores da ciclooxigenase e da NOS (Taylor et al., 1988; Quilley et al., 1997).

Embora utilizemos muito o termo EDHF, atualmente há uma grande tendência ou corrente de pesquisadores que preferem utilizar o termo EDH (hiperpolarização dependente do endotélio). A justificativa se dá pelo fato que a hiperpolarização que ocorre do endotélio para o músculo liso vascular não ocorre apenas por fator difusível, mas, sim, também pelo contato célula-célula via junções comunicantes (Félétou e Vanhoutte, 2013).

A contribuição das respostas mediadas pelo EDHF como um mecanismo de relaxamento dependente do endotélio aumenta à medida que o tamanho do vaso diminui (Shimokawa et al., 1996) e apesar do importante papel fisiológico, que desempenha no controle do tônus vascular, a identidade química desse mediador até hoje é desconhecida e a possibilidade da existência de vários EDHFs já foi levantada (Vanhoutte, 1999). Foram propostos os seguintes candidatos: ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) (Fisslthaler et al., 1999), íons potássio (Edwards et al., 1998), *gap junctions* (Taylor et al., 1998) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Matoba et al., 2000 e Matoba et al., 2003).

Os Ácidos Epoxieicosatrienóicos (EETs) são produtos derivados do ácido araquidônico pela via da enzima citocromo P450, que parecem desempenhar um papel importante na regulação da homeostase vascular (Fleming et al., 2001). A maioria das evidências em favor do EDHF ser um metabólito do ácido araquidônico de curta duração foi obtida utilizando bovinos (Hecker et al., 1994; Campbell et al., 1996), suínos (Hecker et al., 1994; Popp et al., 1996) caninos (Widmann, 1998) e artérias coronárias de humanos (Miura et al., 1999; Quilley e McGiff, 2000). Nestes vasos sanguíneos, as respostas mediadas por EDHF foram bloqueadas por inibidores do citocromo P450. Os EETs relaxam artérias coronárias e hiperpolarizam as células musculares lisas, aumentando a probabilidade de abertura dos canais de potássio ativados por cálcio (Campbell et al., 1996; Gebremedhim et al., 1992; Fisslthaler et al., 1999). Porém o fato de a administração dos EETs ser capaz de promover hiperpolarização e relaxamento em algumas preparações, mas não em outras, como em artérias mesentéricas de coelho (Hutcheson et al., 1999), hepática (Zygmunt et al., 1996) e carótida interna de preá (Chataigneau et al., 1998), fez com que alguns pesquisadores passassem a pensar em outros candidatos a EDHF.

O primeiro trabalho que descreveu ser o íon  $K^+$  um EDHF foi realizado em artérias mesentéricas e hepática de ratos e publicado em 1998. Segundo os autores, o íon  $K^+$  liberado pelas células endoteliais se difundiria para o músculo liso e promoveria hiperpolarização e relaxamento por estimular a bomba de  $Na^+/K^+$ ATPase e os canais de  $K^+$  retificadores de influxo (Kir) (Edwards et al., 1998).

Além desses dois candidatos (EETs e  $K^+$ ), devemos ainda considerar o acoplamento elétrico entre as células endoteliais e as células do músculo liso vascular através das junções comunicantes (*Gap junctions*) (Sandow e Hill, 2000; Sandow et al., 2002), uma vez que as células endoteliais controlam o tônus do músculo liso vascular, não somente pela liberação de substâncias vasoativas, mas também alterando o potencial de membrana de células musculares vizinhas através dessas junções (Yamamoto et al., 1999). Junções comunicantes são regiões de contato intercelular especializadas que conectam

o citoplasma de células adjacentes, permitindo acoplamento elétrico e metabólico. Cada junção comunicante é constituída de proteínas chamadas conexinas (Minamino, 2009). Essa estrutura não apenas liga células endoteliais a células endoteliais e células do músculo liso à células do músculo liso, mas também liga células do músculo liso à células endoteliais, proporcionando assim um caminho de baixa resistência elétrica entre essas duas camadas celulares (Christ et al., 1996).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , outro candidato a EDHF, é conhecido também por causar hiperpolarização do músculo liso vascular (Matoba et al., 2000). Por exemplo, em artérias coronárias de suínos (Hayabuchi et al., 1998) e arteríola cerebral de ratos (Sobey et al., 1997), o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ativa diretamente o canal de potássio ativado por cálcio ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) causando relaxamento. Em contraste, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ativa os canais  $\text{K}^+$  ATP sensíveis e causa relaxamento de arteríolas cerebrais de gatos (Lacza et al., 2002). Assim, o mecanismo de hiperpolarização induzido pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  parece ser complexo, dependendo do vaso sanguíneo utilizado e do tipo de células da parede vascular examinado.

Neste estudo, decidimos verificar a contribuição do EDHF na vasodilatação aguda induzida pelo G1 realizando a inibição da CYP 450 com clotrimazol, uma vez que apesar da natureza química do EDHF ainda ser desconhecida, alguns estudos sugeriram que na vasculatura coronariana de várias espécies (Bauersachs et al., 1996; Fulton et al., 1997; Hayabuchi et al., 1998; Gebremedhin et al., 1998) incluindo artérias coronárias de humanos (Miura e Gutterman, 1998), a expressão da CYP parece ser essencial para mediar as respostas do EDHF, indicando serem os EETs os mais prováveis candidatos a EDHF nestes vasos (Fisslthaler et al., 2000; Edwards et al., 2000 e Fleming, 2002).

Nossos resultados mostraram que houve uma redução significativa na vasodilatação induzida pelo G1 após a inibição da CYP tanto em fêmeas quanto em machos, o que poderia sugerir ter o EDHF, um importante papel como mediador do relaxamento agudo induzido pelo G1 em ambos os grupos.

Além disso, após a inibição da CYP, observamos um significativo aumento da PPC basal em fêmeas, sugerindo que a liberação basal dos produtos da CYP, por exemplo, EDHF, influenciaria significativamente o tônus coronariano neste grupo, corroborando com o que foi demonstrado em estudos do nosso laboratório com animais SHR (Santos et al., 2010).

Este estudo é o primeiro a demonstrar que o EDHF pode mediar a vasodilatação aguda induzida pelo G1 no leito vascular coronariano de ratos normotensos. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o EDHF participa da resposta aguda de relaxamento induzido pelo 17  $\beta$ -estradiol no coração isolado de ratos normotensos de ambos os sexos (Santos et al., 2004). No entanto, um estudo realizado em arteríolas cerebrais penetrantes de machos Sprague-Dawley, mostrou que a inibição da CYP 450 com ácido eicosatetraínoico não reduziu o relaxamento induzido pelo G1 (Murata et al., 2013).

Já está descrito que a resposta de relaxamento dependente do endotélio induzida pelo estrogênio envolve alguns dos candidatos a EDHF. Por exemplo, a deficiência de estrogênio induzida pela ovariectomia prejudicou o relaxamento mediado pelo EDHF em artérias mesentéricas de ratas, devido à redução das conexinas, proteínas importantes que compõem as junções comunicantes (Nawate et al., 2005). Em artérias coronárias epicardiais de suínos, o relaxamento induzido pelo agonista do RE $\beta$ , DPN, foi abolido após inibição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Traupe et al., 2007). Em outro estudo, a incubação com concentrações fisiológicas de estradiol regulou positivamente a atividade da CYP e aumentou a produção de EETs, melhorando assim a dilatação induzida pelo fluxo em arteríolas musculares esqueléticas de ratos machos e fêmeas com deficiência de NO (Huang et al., 2004).

Com a inibição simples das enzimas NOS, COX e CYP, observamos em nosso estudo que o NO, a PGI<sub>2</sub> e o EDHF mostraram ter um papel importante como mediadores da ação do G1 em fêmeas, porém em machos somente a PGI<sub>2</sub> e

os EDHF participaram dessa ação. Entretanto, para que uma ação vasodilatadora possa ser atribuída ao EDHF, é necessária a inibição combinada da NOS e COX com o intuito de elucidar se a redução na resposta vasodilatadora do G1 após a utilização do clotrimazol realmente foi devida à inibição da síntese de EDHF.

Nossos resultados mostraram que após a inibição combinada da NOS e COX, o EDHF foi capaz de manter a resposta de relaxamento induzida pelo G1 apenas em fêmeas (Figura 8a), mas não em machos (Figura 8b). Estudos realizados em nosso laboratório utilizando corações isolados de ratos normotensos (Santos et al., 2004) e espontaneamente hipertensos (Santos et al., 2010) mostraram no entanto, que o EDHF manteve a resposta de relaxamento induzida pelo 17  $\beta$ -estradiol após inibição combinada da NOS e COX em ambos os sexos.

O EDHF é sugerido por alguns autores ser um mecanismo crucial compensatório ou de reserva para a manutenção do fluxo sanguíneo quando a síntese ou ação do NO é reduzida como em situações patológicas (Cohen e Vanhoutte, 1995; Garland et al., 1995). De fato, um estudo utilizando artéria coronária descendente anterior esquerda de corações isolados de bovinos mostrou que a bradicinina foi capaz de promover relaxamento mesmo após inibição combinada da NOS e COX com L-NAME e diclofenaco respectivamente. Além disso, foi demonstrado também que o EDHF foi resistente a um aumento das concentrações locais de ânion superóxido e peroxinitrito, sugerindo um importante papel desse mediador na doença coronariana (Kaw e Hecker, 1999).

A inibição combinada da NOS e da PGI<sub>2</sub> mostrada em nosso estudo foi realizada para mimetizar uma situação patológica onde a síntese do NO e da PGI<sub>2</sub> estivessem prejudicadas. No entanto, o EDHF não foi capaz de manter o mesmo relaxamento induzido pelo G1 em machos, como ocorreu após a inibição simples da CYP. Talvez o EDHF não tenha sido capaz de manter o relaxamento nos machos porque neles a maior expressão da gp91phox poderia

levar a uma maior geração de espécies reativas de oxigênio. De fato, Liu et al. (2002) demonstraram que a via dos canais para potássio que mediarium o relaxamento atribuído ao EDHF parece não ser insensível às alterações nos níveis de espécies reativas, principalmente de peroxinitrito.

Com o intuito de verificar se a  $PGI_2$  desempenharia um papel mais importante que o EDHF como mediador da vasodilatação induzida pelo G1, realizamos a inibição combinada da NOS e CYP. Após essa inibição, a vasodilatação sofreu uma redução significativa em fêmeas nas duas últimas doses de G1, mas não em machos. Santos et al., (2004), utilizando coração isolado de ratos normotensos, demonstraram que a inibição combinada da síntese de NO e EDHF reduziu significativamente o relaxamento coronariano induzido pelo 17  $\beta$ -estradiol, mostrando que a  $PGI_2$  não foi capaz de manter o mesmo relaxamento visto antes dessa inibição em ambos os sexos. Em nosso estudo, esse mediador manteve o mesmo relaxamento visto antes da inibição combinada, apenas nos machos. Uma explicação sugerida para esse importante papel da  $PGI_2$  em machos se dá pelo fato que, em condições fisiológicas, o NO pode interagir com o ânion superóxido, que é um radical livre, gerando o peroxinitrito, um potente inibidor da síntese de  $PGI_2$ , como demonstrado por Zou e Ullrich, 1996, em um experimento utilizando anéis aórticos bovinos. Uma vez inibida a síntese de NO, não ocorreria a formação do peroxinitrito, permitindo a livre atuação da  $PGI_2$ .

Em nosso trabalho, não foi possível realizarmos a remoção endotelial apesar de alguns estudos mostrarem evidências que a resposta vasodilatadora induzida pelo G1 ocorre de modo dependente (Broughton et al., 2010; Meyer et al., 2010; Lindsey et al., 2013b) e independente do endotélio (Meyer et al., 2011; Yu et al., 2011). Diante disso, optamos por realizar a inibição dos três mediadores responsáveis pelo relaxamento endotelial simultaneamente, utilizando L-NAME, indometacina e clotrimazol. No entanto, observamos que o bloqueio triplo foi capaz de reduzir a resposta vasodilatadora do G1 apenas em fêmeas na última dose do agonista GPER, sugerindo que, no leito vascular

coronariano de ratos, a resposta dilatadora do G1 possa ter a participação do músculo liso vascular.

Com o objetivo de avaliar a contribuição dos canais para potássio no relaxamento induzido pelo G1, utilizamos o TEA, um inibidor inespecífico para esses canais no músculo liso vascular. Nossos resultados demonstraram que a resposta dilatadora induzida pelo G1 foi significativamente maior após o bloqueio dos canais para potássio em fêmeas na dose de 3.000 nM e em machos nas doses de 3.000, 6.000 e 10.000 nM, sugerindo que esses canais parecem não participar da resposta de relaxamento induzida por este agonista no leito vascular coronariano de ratos.

Ao contrário, um estudo realizado em artéria coronária descendente anterior esquerda de suínos mostrou que a ativação do GPER com G1 promoveu relaxamento do músculo liso vascular, sendo esta resposta inibida por iberiotoxina, um inibidor dos canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância, demonstrando que, nessa preparação experimental, a ação dilatadora induzida pelo G1 seja via músculo liso vascular por ativação desses canais (Yu et al., 2011).

Experimentos realizados em nosso laboratório em corações isolados de animais SHR mostraram que a resposta vasodilatadora ao 17  $\beta$ -estradiol foi significativamente reduzida após o uso do TEA, tanto em ratos fêmeas quanto em machos.

O objetivo do nosso estudo foi avaliar exclusivamente a ação do GPER no leito vascular coronariano de ratos, por isso, optamos por utilizar o G1 (agonista seletivo deste receptor) e não o estrogênio. O estrogênio é capaz de agir modulando diretamente os canais para potássio no músculo liso vascular (Valverde et al., 1999; Santos et al., 2010). Sugerimos com nossos resultados que o G1 não é capaz de exercer efeito modulatório sobre os canais para potássio no leito coronariano de ratos, como demonstrado em estudos anteriores com estrogênio. Talvez o efeito do G1 no músculo liso vascular seja

via ativação dos canais de cálcio, porém, trabalhamos com coração isolado, em condições experimentais muito próximas das condições fisiológicas, o que nos impediu de bloquearmos estes canais. Caso fizéssemos esse bloqueio, não teríamos a contratilidade das células cardíacas necessárias para o funcionamento do coração pelo método de Langendorff.



## 6. CONCLUSÃO

Diante de nossos resultados podemos concluir que:

- I) G1 é capaz de promover relaxamento do leito vascular coronariano de ratos normotensos de ambos os sexos, sendo esta resposta menos pronunciada em machos, provavelmente pela maior produção de espécies reativas de oxigênio encontradas neste grupo;
- II) A expressão do GPER, SOD-2 e catalase são similares em artérias coronárias de machos e fêmeas;
- III) O GPER participa da modulação do tônus coronariano, uma vez que após sua inibição o tônus basal foi aumentado;
- IV) Os mediadores endoteliais desempenham um importante papel na resposta vasodilatadora induzida pelo G1 em ambos os sexos, sendo que o NO participa do relaxamento apenas nas fêmeas;
- V) A contribuição da  $PGI_2$  na vasodilatação induzida pelo G1 em fêmeas parece ser maior que a contribuição do NO e do EDHF;
- VI) Em machos, a contribuição do EDHF na vasodilatação induzida pelo agonista GPER parece ser maior que da  $PGI_2$ ;
- VII) Os mediadores endoteliais desempenham um papel importante como reguladores do tônus vascular coronariano;
- VIII) O músculo liso vascular parece participar da resposta de relaxamento induzida pelo G1, porém, parece não haver participação dos canais para potássio.

Portanto, nossos achados podem contribuir para um melhor entendimento das ações do G1 sobre o sistema cardiovascular, de forma a tornar esse fármaco uma potencial terapia a ser utilizada na pós-menopausa baseada nos efeitos observados no leito coronariano.

## 7 REFERÊNCIAS

Albanito L, Lappano R, Madeo A, Chimento A, Prossnitz ER, Cappello AR, Dolce V, Abonante S, Pezzi V, Maggiolini M. G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells. *Environmental Health Perspectives* 2008; 116: 1648–1655.

Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Ando S, Maggiolini M. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Research* 2007; 67:1859–66.

Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and channels (GRAC) 3<sup>rd</sup> edition. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153: S1-S209.

Alvarez A, Hermenegildo C, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ. Estrogens inhibit angiotensin II induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. *Circulation research* 2002; 91: 1142-1150.

American Heart Association Scientific Statement. Evidence-Based Guidelines for Cardiovascular Disease Prevention in Women. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular biology* 2004; 24:29-50.

Arefin S, Simoncini T, Wieland R, Hammarqvist Spina S, Goglia L, Kublickiene K. Vasodilatory effects of the selective GPER agonist G-1 is maximal in arteries of postmenopausal women. *Maturitas* 2014; 78:123-130.

Arnal JF, Tack I, Besombes JP, Pipy B, Nègre-Salvayre A. Nitric oxide and superoxide anion production during endothelial cell proliferation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 1996; 271(5 Pt 1):1521-1526.

Baldo MP, Forechi L, Morra EAS, Zaniqueli D, Machado RC, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. *Pharmacological reports* 2011; 63 (4): 975–82.

Barton M. Regulatory role of G-protein–coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circulation Research* 2009; 104: 288-291.

Batlouni M. Endotélio e hipertensão arterial. *Revista brasileira de hipertensão* 2001; 8: 328-838.

Bauersachs J, Hecker M, Busse R. Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *British Journal of Pharmacology* 1994; 113: 1548-1553.

Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation* 1996; 94: 3341-3347.

Berne RM, Rubio R. Regulation of coronary blood flow. *Progress in cardiovascular diseases* outubro 1975; vol. XVIII, n. 2.

Blasko E, Haskell CA, Leung S, Gualtieri G, Miller MH, Mahmoudi M, Dennis MK, Prossnitz ER, Karpus WJ, Horuk R. Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2009; 214: 67–77.

Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. Virtual and biochemical screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nature Chemical Biology* 2006; 2: 207–212.

Borgo MV, Lopez AB, Gouvea SA, Romero WG, Moysés MR, Bissoli NS, Abreu GR. Effects of Tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011; 44: 786-792.

Broughton BR, Miller AA, Sobey CG. Endothelium-dependent relaxation by G protein-coupled receptor 30 agonists in rat carotid arteries. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2010; 298: H1055–H1061.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research* 2000; 87 (10): 840-4.

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation research* 1996; 78: 415 – 423.

Cardoso FA, Campos ER; Mattos EC; Junior AM. Endotélio vascular Parte I: Função e propriedade. *Revista de ciências médicas. PUCCAMP* 1994; 3:76-84.

Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of gene (GPR30) with homology to the G protein–coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 1997; 45: 607-617.

Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. ER $\beta$  has nongenomic action in caveolae. *Molecular Endocrinology* 2002; 16.

Chataigneau T, Félétou M, Duhault J, Vanhoutte PM. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *British Journal of Pharmacology* 1998; 123: 574-580.

Chen YF, Meng QM. Sexual dimorphism of blood pressure in replacement therapy implies that conjugated spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sciences* 1991; 48: 85–96.

Cheng SB, Dong J, Pang Y, Larocca J, Hixon M, Thomas P, Filardo EJ. Anatomical location and redistribution of G protein–coupled estrogen receptor - 1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogen but not aldosterone. *Molecular and cellular Endocrinology* 2013; 382: 950-959.

Cheng SB, Graeber CT, Quinn JA, Filardo EJ. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor G protein coupled 30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids* 2011; 76: 892-896.

Chester AH, Jiang C, Borland JA, Yacoub MH, Collins P. Oestrogen relaxes human epicardial coronary arteries through non endothelium-dependent mechanisms. *Coronary Artery Disease*; 1995; 6: 417-422.

Chevalier N, Bouskine A, Fenichel P. Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30. *International Journal of Cancer* 2012; 130: 241–242.

Chow RW, Handelsman DJ, Ng MK. Minireview: rapid actions of sex steroids in the endothelium. *Endocrinology* 2010; 151: 2411–2422.

Christ GJ, Spray DC, El-Sabban M, Moore LK, Brink PR. Gap junctions in vascular tissue. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circulation Research* 1996; 79: 631–646.

Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92: 3337-3349.

Crofton JT, Ota M, Share L. Role of vasopressin, the renin-angiotensin system, and sex in Dahl salt-sensitive hypertension. *Journal of Hypertension* 1993;11.

De Ziegler D, Bessis R, Frydman R. Vascular resistance of uterine arteries: Physiological effects of estradiol and progesterone. *Fertility Sterility* 1991; 55: 775-779.

Dechering K, Boersma C, Mosselman S. Estrogen Receptors alpha and beta Two Receptors of a Kind. *Current Medicinal Chemistry* 2000; 7: 561-576.

Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologna CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu R, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nature Chemical Biology* 2009; 5: 421-427.

Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi SI, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Prossnitz ER. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counter selectivity. *The journal of steroid Biochemistry and molecular Biology* 2011; 127: 358-366.

Deschamps AM, Murphy E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER is cardioprotective in male and female rats. *American Journal of physiology* 2009; 297: H1806-H1813.

Dong S, Terasaka S, Kiyama R. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental Pollution* 2011; 159: 212-218.

Dong WH, Chen JC, He YL, Xu JJ, Mei YA. Resveratrol inhibits K(v)2.2 currents through the estrogen receptor GPR30-mediated PKC pathway. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2013; 305: C547–557.

Dubey RK, Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *American journal of Physiology, Renal Physiology* 2001; 280: 365-88.

Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annual Review of Physiology* 2005; 67: 335-376.

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396: 269–272.

Edwards G, Thollon C, Gardener MJ, Feletou M, Vilaine JP, Vanhoutte PM, Weston AH. Role of gap junctions and EETs in endothelium- dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. *British Journal of Pharmacology* 2000; 129:1145-1154.

Évora PRB. Laços históricos entre circulação sanguínea, endotélio e hipertensão arterial. *Revista brasileira de hipertensão* 1999; 6.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium–dependent hyperpolarization: No longer an F-word. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2013; 61: 91-92.

Ferreira MCF, Souza KZD, Drummont JSF, Barra AA. Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio: Novas moléculas e aplicações práticas. *Femina* 2011; 39: 9.

Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Lipid Mediators* 2007; 82: 109-118.

Figuerola-Valverde L, Diaz-Cedillo F, Ramos-Lopez M, Garcia-Cervera E, Quijano K, Cordoba J. Changes induced by estradiol - ethylenediamine derivative on perfusion pressure and coronary resistance in isolated rat heart: L-type calcium channel. *Biomedical Papers* 2011; 155: 27-32.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton JAR. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology* 2000; 14: 1649-1660.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton Jr AR, Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular Endocrinology* 2002; 16: 70–84.

Filice E, Recchia AG, Pellegrino D, Angelone T, Maggiolini M, Cerra MC. A new membrane G protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17 $\beta$ -estradiol in the male rat. *Journal of Physiology Pharmacology* 2009; 60: 3–10.

Fisher M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin Systems and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 2002; 53: 672–677.

Fisslthaler B, Fleming I, Busse R. EDHF: A cytochrome P450 metabolite in coronary arteries. *Seminars in perinatology* 2000; 24:15-19.

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999; 401: 493–497.

Fleming I, Fisslthaler B, Michaelis UR, Kiss L, Popp R, Busse R. The coronary EDHF stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells. *Pflügers Archiv. European journal of physiology* 2001; 442: 511–518.

Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2010; 459: 793-806.



Fleming I. To move or not to move? Cytochrome P450 products and cell migration. *Circulation Research* 2002; 90:936-938.

Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 2010; 459: 923–939.

Fulton D, McGigg JC, Wolin MS, Kaminski P, Quilley J. Evidence against a cytochrome P450-derived reactive oxygen species as the mediator of nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the perfused heart of the rat. *The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* 1997; 280: 702-709.

Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 346: 904-910.

Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *Journal cardiovascular pharmacology* 1984; 6: S336-S343.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.

Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme mRNA. *Hypertension* 1999; 33: 323-328.

Ganten U, Schroder G, Witt M, Zimmerman F, Ganten D, Stock G. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *Journal of Hypertension* 1989; 7:721–726.

Gardner G, Banka CL, Roberts KA, Mullick AE, Rutledge JC. Modified LDL-mediated increases in endothelial layer permeability are attenuated with 17 beta-estradiol. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19: 854-861.

Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends in pharmacological sciences* 1995; 16: 23-30.

Gebremedhin D, Harder DR, Pratt PF, Campbell WB. Biosay of an endothelium-derived hyperpolarizing factor from bovine coronary arteries: role of a cytochrome P450 metabolite. *Journal of Vascular Research* 1998; 35: 274-284.

Gebremedhin D, Ma YH, Falck JR, Roman RJ, Vanrollins M, Harder DR. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 1992; 263: H519–H525.

Golding EM, Kepler TE. Role of estrogen in modulating EDHF-mediated dilations in the female rat middle cerebral artery. *American Journal of physiology* 2001; 280: H2417-H2423.

Gragasin FS, Yi XU, Arenas IA, Neelam K, Sandra T. Davidge Estrogen Reduces Angiotensin II Induced Nitric Oxide Synthase and NAD(P)H Oxidase Expression in Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23:38-44.

Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorzyczewski J, Feldman RD. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension* 2011; 57: 442–451.

Gruchow HW, Anderson AJ, Barboriak JJ, Sobocinski KA. Postmenopausal use of estrogens and occlusion of coronary arteries. *American Heart Journal* 1988; 115: 954-63.

Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya L, Minotti R, Nguyen HH, Heigl A, Lachat M, Genoni M. Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension* 2007; 49: 1358-1363.

Hale GE, Hughes CL, Cline JM. Endometrial Cancer: Hormonal Factors, The Perimenopausal "Window Of Risk," And Isoflavones. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87(1):3-15.

Halliwell B, Gutteridge JCM. *Free radicals in biology and medicine*, 3 th ed. Oxford University Press, 1999.

Han G, Li F, Yu X, White RE. GPER: A novel target for non- genomic estrogen action in the cardiovascular system. *Pharmacology Research* 2013; 02-008.

Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Heart Vessels* 1998; 13: 9–17.

Haynes MP, Sinha D, Russel KS, Collinge M, Fulton D, Morales RM, Sessa WC, Bender JR. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via PI3k- AKT pathway in human endothelial cells. *Circulation Research* 2000; 87; 677-682.

Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *The Journal of Physiology* 1994; 481: 407–414.

Hermann M, Flammer A, Luscher TF. Nitric oxide in Hypertension. The journal of chemical hypertension 2006; 8.

Heron M. National Vital Statistics Reports Deaths : Leading Causes for 2010. National Vital Statistics Reports 2013; 62: 1–97.

Herrington DM, Reboussin DM, Klein PK, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Geisinger KR. The Estrogen Replacement and atherosclerosis (ERA) Study: Study Design and Baseline Characteristics of the cohort. Controlled clinical Trials 2000; 21: 257-285.

Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reproductive biology and endocrinology 2003; 1-52.

Huang A, Sun D, Wu Z, Yan C, Carrol MA, Jiang H, Falck JR, Kaley G. Estrogen elicits cytochrome P450 – mediated flow-induced dilation of arterioles in NO deficiency: role of PI3k-AKT phosphorylation in genomic regulation. Circulation research 2004; 94: 245-252.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furderg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E, for the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. The journal of the American medical association 1998; 280:605-13.

Hutcheson IR, Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. Nitric oxide independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication: Role of gap junctions and phospholipase A<sub>2</sub>. Circulation Research 1999; 84: 53-63.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical

properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research* 1987; 61: 866 -879.

Jang EJ, Seok YM, Arterburn JB, Olatunji LA, Kim KI. GPER-1 agonist G1 induces vasorelaxation through activation of epidermal growth factor receptor-dependent signaling pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013; 65: 1488- 1499.

Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Acute effect of 17 beta-estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. *American Journal of Physiology-Heart and circulatory physiology* 1992; 263 (1 Pt 2): H271-5.

Kajta M, Rzemieniec J, Litwa E, Lason W, Lenartowicz M, Krzeptowski W, Wojtowicz AK. The key involvement of estrogen receptor beta and G protein-coupled receptor 30 in the neuroprotective action of daidzein. *Neuroscience* 2013; 238: 345–360.

Kaw S, Hecker M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor, but nitric oxide or prostacyclin release, is resistant to menadione-induced oxidative stress in the bovine coronary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of pharmacology* 1999; 359 (2): 133-139.

Keaney JF, Shwaery GT, Xu A, Nilcolsi RJ, Loscalzo J. 17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 1994; 89: 2252-2259.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America* 1996; 93: 5925-5930.

Kurt AH, Buyukafsar K. Vasoconstriction induced by G1, a protein-coupled oestrogen receptor 1 agonist, in the isolated perfused rat kidney. *European journal of pharmacology* 2013; 702: 71-78.

Kvingedal AM, Smeland EB. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Letters* 1997; 407: 59-62.

Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, Miller AW, Busija DW. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2002; 283: H406–H411.

Laemmli UK. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Lamping KG, Nuno DW. Effects of 17 beta-estradiol on coronary microvascular responses to endothelin-1. *American Journal of Physiology Heart and circulation physiology* 1996; 271: 1117–1124.

Lindsey SH, Carver KA, Prossnitz ER, Chappell MC. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat. *Journal Cardiovascular Pharmacology* 2011; 57: 598–603.

Lindsey SH, Cohen JA, Brosnihan KB, Gallagher PE, Chappell MC. Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen1.Lewis rats. *Endocrinology* 2009; 150: 3753-3758.

Lindsey SH, da Silva AS, Silva MS, Chapell MC. Reduced vasorelaxation to estradiol and G1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2013a; 305: E113-E118.

Lindsey SH, Liu L, Chappell MC. Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth cAMP signaling. *Steroids*, 2013b; 81:99-102

Liu Y, Terata K, Chai Q, Li H, Kleinman LH, Gutterman DD. Peroxynitrite inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. *Circulation Research* 2002; 91: 1070–1076.

Luksha L, Poston L, Gustafsson JA, Hultenby K, Kublickiene K. The oestrogen receptor  $\beta$  contributes to sex related differences in endothelial function of murine small arteries via EDHF. *The Journal of Physiology* 2006; 577: 945-955.

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17 beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *The journal of biological chemistry* 2004; 279: 27008–27016.

Mansur AP, Favarato D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. *Arquivos Brasileiros de cardiologia*. São Paulo. 2012.

Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I, Urakami-Harasawa L, Mukai Y, Hirakawa Y, Akaike T, Takeshita A. Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23:1224–1230.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106: 1521-1530.

Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, Kosokawa K, Kawamura A, Itose M, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neuroscience Letters* 2008; 441: 94–99.

Matsusaka T, Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annual Review of Physiology* 1997; 59: 395-412.

Mendelsohn ME, Karas RH. Hrt and the young at heart. *The New England Journal Medicine* 2007; 356: 2639-2641.

Mensah GA, Brown DW. An Overview Of Cardiovascular Disease Burden In The United States. *Health Affairs* 2007; 26:38-48.

Meyer MR, Baretella O, Prossnitz ER, Barton M. Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. *Pharmacology* 2010; 86: 58–64.

Meyer MR, Prossnitz ER, Barton M. The G protein coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascular Pharmacology* 2011; 55:17-25.

Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HHHW, Sobey CG. Effect of Gender on NADPH-Oxidase Activity, Expression and Function in the Cerebral Circulation Role of Estrogen. *Stroke* 2007; 38: 2142-2149.

Minamino T. Gap junctions mediate the spread of ischemia-reperfusion injury. *Japanese Circulation Journal* 2009; 73(9):1591-1592.

Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circulation Research* 2003; 92: 31–40.



Miura H, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 mono-oxygenase and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *Circulation Research* 1998; 83: 501-507.

Miura H, Lui Y, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution of nitric oxide and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels. *Circulation* 1999; 99: 3132–3138.

Mizukami Y. *In Vivo* Functions of GPR30/GPER-1, a Membrane Receptor for Estrogen: From Discovery to Functions *In Vivo*. *Endocrine Journal*, 2010; 57(2): 101-107.

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacological Reviews* 1978; 30: 293-331.

Monsalve E, Oviedo PJ, Garcia-Perez MA, Tarin JJ, Cano A, Hermenegildo C. Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovascular research* 2007; 73: 66-72.

Moyses MR, Barker JA, Cabral AM. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart- *Brazilian journal of medical and biological Research* 2001; 34: 949-958.

Mucida, A. *O sujeito não envelhece: psicanálise velhice* (2<sup>a</sup> ed.). Belo Horizonte: Autêntica, 2006.

Murata T, Dietrich HH, Xiang C, Ralph GCJ. G protein-coupled estrogen receptor agonist improves cerebral microvascular function after hypoxia/reoxygenation injury in male and female rats. *Stroke* 2013; 44: 779-785.

Murray CJL, Lopez AD. The global burden of disease. World Health Organization 1996.

Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. The journal of the American medical association 1999; 282 :1523-1529.

Nahás EAP, Neto JN, De Luca LA, Traiman P, Pontes A, Dalben I. Efeitos da isoflavona sobre o sintomas climatéricos e o perfil lipídico na mulher em menopausa. RBGO 2003; 25: 5.

Nawate S, Fukao M, Sakuma I, Soma T, Nagai K, Takikawa O, Miwa S, Kitabatake A. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. British journal of pharmacology 2005; 144 (2):178-189.

Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, Baumer AT, Albory K, Sauer H, Bohm M. Differential effects of estrogen andprogesterone on AT1 receptor gene expression in vascularsmooth muscle cells. Circulation 2000; 102: 1828–1833.

Nilsson BO, Olde B, Leeb-Lundber LM. G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. British Journal of Pharmacology 2011; 163:1131–1139.

Ong KL, Tso AW, Lam KS, Cheung BM. Gender difference in blood pressure control and cardiovascular risk factors in Americans with diagnosed hypertension. Hypertension. 2008; 51(4):1142-1148.

Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications 1996; 228: 285-292.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

Pantaleão JAS, Henriques HN, Carvalho ACB, Pollastri CE, Filho PJS, Silva MAG. Efeitos da tibolona sobre o endométrio de ratas castradas. *Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia* 2009; 31: 24-130.

Paoletti R, Wenger NK. Review of the international position paper on women's health and menopause. *Circulation* 2003; 107: 1336-1339.

Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. Estrogen receptor-alpha mediates the protective of estrogen against vascular injury. *Circulation Research* 2002; 90: 1087-1092.

Pasqualini C, Leviel V, Guibert B, Faucon Biguet N, Kerdelhui B. Inhibitory action of acute estradiol treatment on the activity and quantity of tyrosine hydroxylase in the median eminence of ovariectomized rats. *Journal of Neuroendocrinology* 1991; 3: 575-585.

Pendergrass KD, Pirro NT, Westwood BM, Ferrario CM, Brosniham KB, Chappel MC. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2008; 295: H10–H20.

Petrie WK, Dennis MK, Hu C, Dai D, Arterburn JB, Smith, HO, Hathaway HJ, Prossnitz ER. G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth. *Obstetrics and Gynecology International* 2013; 472-720.

Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogen and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion *Critical Reviews in oncology/Hematology* 2004; 51: 55-67.

Polisseni AF, Araújo DAC, Polisseni F, Junior CAM, Polisseni J, Fernandes E S, Guerra MO. Depressão e ansiedade em mulheres climatéricas: fatores associados. *Revista brasileira de Ginecologia Obstetrícia* 2009; 31(1): 28-34.

Popp R, Bauersachs J, Hecker M, Fleming I, Busse R. A transferable,  $\beta$ -naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *The journal of Physiology* 1996; 497: 699–709.

Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, Sieck GC. Estrogen increases  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and circulatory physiology* 1999; 276 (3 Pt 2):H926-934.

Prossnitz ER, Barton M. The G-protein- coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews endocrinology* 2011; 7:715-726

Pupo M, Pisano A, Lappano R, Santolla MF, De Francesco EM, Abonante S, Rosano C, Maggiolini M. Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environmental Health perspectives* 2012; 120: 1177–1182.

Quilley J, Fulton D, McGiff JC. Hyperpolarizing factors: *Biochemical Pharmacology* 1997; 54: 1059-1070.

Quilley J, McGiff JC. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends in Pharmacological Sciences* 2000; 21:121–124.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender differences in the development of hypertension in SHR: role of the renin–angiotensin tend to speak about “estrogens”, rather than estradiol, system. *Hypertension* 2000; 35: 480–483.

Reckelhoff JF. Gender Differences in the Regulation of Blood Pressure. *Hypertension* 2001; 37:1199-1208.

Reid I. A. Interactions between ANG II , sympathetic nervous system , and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *American Journal of Physiology* 1992; 262: E763–E778.

Reslan OM, Khalil RA. Vascular effects of estrogenic menopausal hormone therapy. *Reviews on Recent Clinical Trials* 2012; 7: 47-70.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005; 307:1625–1630.

Rodriguez E, Lopez R, Paez A, Masso F, Montano LF. 17 Beta-estradiol inhibits adhesion of Leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription. *Life Sciences* 2002; 71: 2181-2193.

Roesch DM, Tian Y, Zheng W, Shi M, Verbalis JG, Sandberg K. Estradiol attenuates angiotensin-induced aldosterone secretion in ovariectomized rats. *Endocrinology* 2000; 141: 4629- 4636.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick, ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *The journal of the American medical association* 2002; 288:321-33.

Rowland NE, Fregly MJ. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clinical Experimental Hypertension* 1992; A14: 367–375.

Rowlands DJ, Chapple S, Siow RC, Mann GE. Equol-stimulated mitochondrial reactive oxygen species activate endothelial nitric oxide synthase and redox signaling in endothelial cells: roles for F-actin and GPR30. *Hypertension* 2011; 57, 833–840.

Ruiz-Sanz JL, Navarro R, Martínez R, Martín C, Lacort M, Matorras R, Ruiz Larrea B. 17  $\beta$ -estradiol affects in vivo the low density lipoprotein composition, particle, and oxidizability. *Free radical Biology e Medicine*, 2001.

Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris JF, Prossnitz ER, Kawata M. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology* 2007; 148: 5842-5850.

Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E. Acute relaxant effects of 17-beta estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery. *Steroids* 2002; 67: 339-346.

Samman SA, Crawford MH. Estrogen and cardiovascular function after menopause. *Journal American college of cardiology* 1995; 26:1403-1410.

Sadow SL, Hill CE. Incidence of Myoendothelial Gap Junctions in the Proximal and Distal Mesenteric Arteries of the Rat Is Suggestive of a Role in Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses. *Circulation Research* 2000; 86: 341-346.

Sadow SL, Tare M, Coleman HA, Hill CE, Parkington HC. Involvement of Myoendothelial Gap Junctions in the Actions of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Circulation Research* 2002; 90: 1108-1113

Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Moysés MR. Endothelial mediators of 17 $\beta$  estradiol – induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004; 37: 69-575.

Santos RL, Marin EB, Gonçalves WL, Bissoli NS, Abreu GR, Moyses MR. Sex differences in the coronary vasodilation induced by  $17\beta$  estradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica* 2010; 200: 203-10.

Schunkert H, Danser J, Hense HW, Derkx FHM, Kurzinger S, Riegger GAJ. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 1997; 95: 39-45.

Sheng ZG, Huang W, Liu YX, Zhu BZ. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013; 267: 88–94.

Sherman TS, Chambliss KL, Gibson LL, Pace MC, Mendelsohn ME, Pfister SL, Shaul PW. Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002; 26: 610-616.

Shimokawa H, Yasutake Fujii K. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decrease in endothelium dependent relaxation in rat mesenteric. *Journal Cardiovascular Pharmacology* 1996; 28: 703-711.

Silva RBR. A mulher de 40 anos: sua sexualidade e seus afetos. Belo Horizonte: Gutenberg 2006.

Simoncini T, Hafezi Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000; 407: 538-541.

Simoncini T. Mechanisms of action of estrogen receptors in vascular cells: relevance for menopause and aging. *Climacteric* 2009; 12: 6-11.

Simsekylmaz S, Liehn EA, Militaru C, Vogt F. Progress in interventional cardiology. Challenges for the future. *Thrombosis e Homeostase* 2015; 113: 464-472.

Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K<sup>+</sup> channels. *Stroke* 1997; 28: 2290– 2294.

Sobrino A, Oviedo PJ, Novella S, Fernandez AL, Bueno C, Pérez- Garcia MA, Tarin JJ, Cano A, Hermenegildo C. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- $\alpha$ . *Journal of molecular endocrinology* 2010; 44: 237-246.

Soloff MS, Szego CM. Purification of estradiol receptor from rat uterus and blockade of its estrogen-binding function by specific antibody. *Biochemical and Biophysical Research communication* 1969; 34:141–7.

Spritzer PM, Wender MCO. Terapia hormonal na menopausa. Quando não usar. *Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia* 2007; 51-7.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circulation Research* 2003; 93(2):170-7.

Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, Rubanyi GM. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *The Lancet* 1997; 349 (9059):1146-1147.



Sullivan JC, Sasser JM, Pellock JS. Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2007; 292.

Takada Y, Kato C, Kondo S, Korenaga R, Ando J. Cloning of cDNA encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochemical Biophysical Research Communications* 1997; 240: 737-741.

Talwar GP, Segal SJ, Evans A, Davidson OW. The binding of estradiol in the uterus: a mechanism for depression of RNA synthesis. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America* 1964; 52:1059–1066.

Taylor HJ, Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxations in rabbit iliac artery by 18- $\alpha$  glycyrrhetic acid. *British journal of pharmacology* 1998; 125: 1–3.

Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends in pharmacological Sciences* 1988; 9: 272-274.

Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. Differential effects of 17 beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *British Journal of Pharmacology* 2000; 129: 1301-1308.

Tep-arreenan P, Kendall DA, Randall MD. Mechanisms of vasorelaxation to 17 beta-oestradiol in rat arteries. *European Journal of pharmacology* 2003; 476: 139-149.

Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel

mechanism of endocrine disruption. *The Journal of Steroid Biochemistry and molecular Biology* 2006; 102: 175– 179.

Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005; 146: 624–632.

Traupe T, Stettler CD, Li H, Haas E, Bhattacharya I, Minotti R, Barton M. Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries. *Hypertension* 2007; 49: 1364-1370.

Tsang SY, Yao X, Chan FL, Wong CM, Chen ZY, Laher I, Huang Y. Estrogen and tamoxifen modulate cerebrovascular tone in ovariectomized female rats. *Hypertension* 2004; 44 (1): 78-82.

Valença CN, Nascimento JMF, Germano RM. Mulher no climatério: reflexões sobre desejo sexual, beleza e feminilidade. *Saúde Soc.* 2010; 19 (2): 273-5.

Valverde JM, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Patricio O, Bahamonde M, Mann GE, Vergara C, Latorre R. Acute activation of maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit. *Science* 1999; 285: 1929-1931.

Vanhoutte PM. Endothelial Control of Vasomotor Function From Health to Coronary Disease. *Circulation Journal* 2003; 67: 572 –575.

Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing. The Netherlands, Harwood Academic Publishers 1999; 1-305.

Vaziri SM, Evans JC, Larson MG, Wilson PW. The impact of female hormone usage on the lipid profile. The Framingham Offspring Study. *Archives of Internal Medicine* 1993; 153: 2200–2206.

Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M. 17 beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30. *Molecular Pharmacology* 2006; 70: 1414-1423.

Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17 beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *The FASEB Journal* 2001;15 (12): 2121-30.

Wang C, Dehghani B, Li Y, Kaler LJ, Proctor T, Vandembark AA, Offner H. Membrane estrogen receptor regulates experimental autoimmune encephalomyelitis through up-regulation of programmed death. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 3294–3303.

White RE, Han G, Dimitropoulou C, Zhu S, Miyake K, Fulton D, Dave S, Barman SA. Estrogen-induced contraction of coronary arteries is mediated by superoxide generated in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and circulatory physiology* 2005; 289: H1468-H1475.

White RE. Estrogen and vascular function. *Vascular Pharmacology* 2002; 38: 73-80.

WHO. Women and health: today's evidence tomorrow's agenda. 1. ed. Geneva: WHO Press 2009; p. 91.

Widmann MD, Weintraub NL, Fudge JL, Brooks LA, Dellsperger KC. Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 1998; 274: H283–H289.

Yamamoto Y, Maeda K, Suzuki H. Endothelium –dependent hyperpolarization and intracellular electrical coupling in guinea -pig mesenteric arterioles. *Journal of physiology* 1999; 514 (2): 505-513.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 1994; 74: 139-162.

Yu X, Ma H, Barman SA, Liu AT, Sellers M, Stallone JN, et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2011; 301: E882–8.

Zhang XF, Tan BK. Antihyperglycemic and antioxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2000; 27: 358–363.

Zou MH, Ullrich V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Letters* 1996; 382: 101-104.

Zygmunt PM, Hogestatt ED. Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation to nitroarginine in the rat hepatic artery. *British Journal of Pharmacology*, 1996; 117:1600-1606.